HAL
open science

Génération d'un nouveau prion spontané et analyse biologique et structurale de fibres amyloïdes lui correspondant

Djabir Larkem

To cite this version:

Djabir Larkem. Génération d'un nouveau prion spontané et analyse biologique et structurale de fibres amyloïdes lui correspondant. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB030 . tel-03544006

HAL Id: tel-03544006

https://pastel.hal.science/tel-03544006v1

Submitted on 26 Jan 2022

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.

université PARIS-SACLAY

Génération d'un nouveau prion spontané et analyse biologique et structurale des fibres amyloïdes lui correspondant

Generation of a new spontaneous prion and biological and structural analysis of the corresponding amyloid fibrils

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 : UMR 892, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France
Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 30/06/2021, par

Djabir LARKEM

Composition du Jury

Sven SAUPE Directeur de recherche, CNRS (Univ. Bordeaux)	Président
Philippe DERREUMAUX Professeur, Université de Paris	Rapporteur & Examinateur
Juan Maria TORRES Directeur de recherche, INIA (Espagne)	Rapporteur & Examinateur
Yves BOULARD Ingénieur de recherche, CEA (Univ. Paris-Saclay)	Examinateur
Sophie MOUILLET-RICHARD Chargée de recherche, INSERM (Univ. Paris)	Examinatrice

Direction de la thèse

Michel DRON Chargé de recherche, INSERM (Univ. Paris-Saclay)	Directeur de thèse
Christina SIZUN Directrice de recherche, CNRS (Univ. Paris-Saclay)	Co-directrice & Examinatrice

Thèse de doctorat

NNT : 2021UPASB030

Sommaire

SOMMAIRE 2
REMERCIEMENTS 5
TABLE DES ILLUSTRATIONS 7
LISTE DES ABREVIATIONS 9

I. INTRODUCTION 11
1. Les maladies à prion 11
1.1. Introduction aux maladies à prion 11
1.2. Les maladies à prion animales 12
1.2.1. La tremblante des petits ruminants. 12
1.2.2. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine 13
1.2.3. Autres ESST animales 15
1.3. Les maladies à prion humaines 16
1.3.1. La forme sporadique 17
1.3.2. Les formes génétiques 18
1.3.2.1. La forme génétique de la MCJ 19
1.3.2.2. Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 20
1.3.2.3. L'Insomnie Fatale Familiale 20
1.3.3. Les formes infectieuses 21
1.3.3.1. Le Kuru 21
1.3.3.2. Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob 21
1.3.3.3. Les accidents iatrogènes **22**
2. La protéine prion cellulaire 23
2.1. Gènes et expression de la PrP^C 23
2.1.1. Le gène Prnp 23
2.1.2. Expression de Prnp 25
2.2. Traduction et modifications post-traductionnelles 26
2.2.1. Biosynthèse, maturation et dégradation 26
2.2.2. Glycosylation 27
2.2.3. Coupures protéolytiques de la PrP cellulaire 27
2.3. Structure de la PrP^C 29
2.4. Les différentes fonctions de la PrP^C 32
2.4.1. Rôle de la PrP dans la myélinisation 32
2.4.2. Rôle neuroprotecteur de la PrP 33
2.4.3. Rôle de la PrP dans les fonctions synaptiques et la transduction de signal 33
2.4.4. Effet anti-apoptotique de la PrP 34
2.4.5. Rôle lié à l'interaction entre la PrP et les oligomères d'Aß 34
2.4.6. Rôle antioxydant de la PrP cellulaire 35
3. La protéine prion pathogène 36
3.1. Présentation de la PrP^{Sc} 36
3.2. Propriétés physicochimiques et données structurales 38
3.2.1. Données structurales à basse résolution 38
3.2.2. Modèles proposés pour la structure de la PrP^{Sc} 40

3.2.2.1. Modèle Parallel in register 41
3.2.2.2. Modèle bêta Solénoïde 42
3.2.2.3. Autres modèles 42
3.2.3. Avancées récentes: structure de la PrP^{Sc} et des fibres 43
3.3. Mécanismes de conversion et de réplication 47
3.3.1. Le modèle autocatalytique 47
3.3.2. Le modèle de nucléation-polymérisation 48
3.4. Notions de souche et de barrière d'espèce 49
3.4.1. Le concept de souche 49
3.4.2. La notion de barrière d'espèce 52
4. La forme enrichie en feuillet bêta de la PrP recombinante 53
4.1. Fibres amyloïdes et oligomères de PrP recombinante 53
4.2. Structure des fibres de PrP recombinante 54
5. La neurotoxicité des prions 56
5.1. PrP^{Sc} et toxicité 56
5.1.1. Perte des fonctions de la PrP^{C} 56
5.1.2. Toxicité de la PrP^{Sc} 57
5.1.3. Hypothèse de l'intermédiaire toxique 57
5.2. Mécanismes impliqués dans la mort neuronale 58
6. Les modèles expérimentaux de réplication des prions 59
6.1. Les modèles animaux 59
6.2. Les modèles cellulaires 61
6.2.1. Les cultures primaires et autres systèmes ex vivo 62
6.2.1.1. Les cultures primaires de neurones en grain du cervelet 62
6.2.1.2. Les cultures d'astrocytes 63
6.2.1.3. Coupes de cervelet, neurosphères et agrégats organoides 63
6.2.2. Les lignées cellulaires continues susceptibles aux prions 64
6.3. Amplification in vitro 65
6.3.1. « Cell free conversion assay » 65
6.3.2. « Protein Misfolding Cyclic Amplification » (PMCA) 66
6.3.3. « Quaking-Induced Conversion » (QuIC) 67

II. OBJECTIF 69

III. RESULTATS 70

Partie 1 : Une délétion dans la PrP induit la génération d'un prion spontané d'un nouveau type en culture de cellule 70
1. Introduction de la partie 1 70
2. Résultats de la Partie 1 : article JBC 2020 73
3. Discussion de la partie 1 74
4. Conclusion de la partie 1 76
5. Travaux en cours et perspectives de la partie 1 78

Partie 2 : Infectivité des fibres amyloïdes de PrP ovine recombinante Δ190-196 en culture de cellule 80
1. Introduction de la partie 2 80
2. Résultats de la Partie 2 : manuscrit en préparation 82

3. Discussion de la partie 2 **121**
4. Conclusion de la partie 2 **123**
5. Travaux en cours et perspectives de la partie 2 **124**

Partie 3 : Étude structurale des fibres amyloïdes de PrP recombinante Δ190-196 **125**
1. Introduction **125**
2. Résultats **127**
2.1. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes de PrPΔ190-196 recombinante de pleine longueur par RMN du solide 127
2.2. Analyse des régions flexibles des fibres amyloïdes de PrPΔ190-196 par RMN du solide 135
2.3. Approches visant à réduire l'hétérogénéité structurale des fibres de PrPΔ190-196 140
2.3.1. Homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196 par amorçage « seeding » 140
2.3.2. Homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196 par maturation « annealing » 144
2.4. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes du fragment 113-234 de PrPΔ190-196 recombinante par RMN du solide 146
2.5. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après maturation 151
2.5.1. Spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaires de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après « annealing » (avant traitement PK) 151
2.5.2. Spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaires de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après « annealing » et traitement PK 154
2.6. Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB de tous les résidus identifiés dans les différents spectres attribués. 158
3. Matériel et méthodes **163**
3.1. Expression et purification de la PrP recombinante 163
3.2. Formation des fibres amyloïdes de PrP recombinante 163
3.3. Fibrillation de PrP recombinante en présence d'amorce 164
3.4. Maturation des fibres amyloïdes de PrP recombinante 164
3.5. RMN du solide 165
4. Discussion **166**
5. Conclusion **170**
6. Perspectives **170**

IV. DISCUSSION GENERALE DE LA THÈSE 172

V. CONCLUSION GENERALE 180

VI. PERSPECTIVES GENERALES DE LA THÈSE 182

VII. BIBLIOGRAPHIE 185

Remerciements

Cette thèse a été pour moi une expérience à la fois passionnante, enrichissante et très exigeante. L'aboutissement de ce travail n'a été possible que grâce au soutient que j'ai reçu de la part de nombreuses personnes et je tiens à travers ces quelques lignes leur témoigner toute ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Michel Dron, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce projet. Michel j'ai eu énormément de chance de travailler à tes côtés, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, pour la patience dont tu as fait preuve à mon égard, les conseils que tu m'as apportés, ton soutient et ta bienveillance. Merci de m'avoir fait bénéficier de ton expérience tout en me donnant la liberté d'expérimenter mes propres idées.

Je remercie très sincèrement ma co-directrice de thèse, Christina Sizun. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir tant appris et de m'avoir soutenu tout au long de ce projet. Je te suis très reconnaissant pour la disponibilité et la gentillesse don tu as fait preuve ces dernières années.

Je remercie le professeur Philippe Derreumaux ainsi que le professeur Juan Maria Torres de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer et de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Merci pour le temps et l'attention que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je remercie les docteurs Sophie Mouillet-Richard, Yves Boulard et Sven Saupe, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci d'avoir apporté votre vision scientifique à ce travail. Je remercie aussi le docteur Inaki Guijarro pour les précieux conseils qu'il m'a apportés en tant que membre de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier Human Rezaei, qui a été un soutien précieux durant ces 3 ans et demis. Merci d'avoir à chaque fois pris le temps d'assouvir ma soif de connaissance, ton enthousiasme pour la science a été pour moi une vraie source d'inspiration. Je te remercie particulièrement pour le soutient bienveillant que tu as su m'apporter dans les moments les plus difficiles.

Je remercie Vincent Béringue de m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Travailler dans l'équipe MAP2 a été un réel plaisir pour moi. Je remercie aussi Mohamed pour son soutient et son humour, Angélique pour sa bonne humeur, Sandrine pour les conversations enrichissantes que nous avons partagées et Davy pour sa gentillesse, sa pédagogie et la rigueur de son esprit scientifique. Merci aussi à Jan, Elise, Laetitia, Pierre, Fabienne, Jérôme et Agnès pour l'incroyable ambiance qui règne au sein de cette équipe, merci pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Je remercie chaleureusement mes parents pour leur soutien indéfectible et pour tous les sacrifices qu'ils ont fait pour moi, je vous aime et je vous dois tout. Merci à mes sœurs Chanez, Manel et Fatiha pour leurs encouragements et leur présence.

Merci à Racha pour ton soutient, ton amour et la force que tu me donnes. Les choses auraient été bien plus difficile sans le bonheur que tu m'apportes.

Un merci tout particulier à Soraya, en dépit des kilomètres nous avons vécu cette aventure ensemble. Merci aussi à Nabile, Hamide, Asma, Selma et Amira pour votre précieuse amitié.

Finalement je dédie cette thèse à ma défunte grand-mère Fatiha qui je le sais aurait été très fière de moi, tu resteras a jamais dans nos cœurs.

Table des illustrations

Figure 1 : Caractéristiques neuropathologiques d'une encephalopathie spongiforme. 18
Figure 2 : Mutations et polymorphismes du gène *PRPN*. 19
Figure 3 : Localisation chromosomique et organisation des gènes de la famille prion. 24
Figure 4 : Représentation des coupures protéolytiques de la PrP cellulaire. 29
Figure 5 : Structure de la PrP^{C} 31
Figure 6 : Le modèle de structure de la PrP^{Sc} « parallel-in-register» 41
Figure 7 : Le modèle de structure de la PrP^{Sc} en tonnelet « beta Solenoid » 44
Figure 8 : Structure de la souche 263K de prion de hamster par cryo-EM 45
Figure 9 : Structure des fibres amyloïdes de PrP recombinante obtenue par cryo-EM. 46
Figure 10 : Mécanismes de conversion et de réplication des prions. 49
Figure 11 : Caractéristiques permettant de différencier deux souches de prions 50
Figure 12 : Principes de fonctionnement de la PMCA et de la RT-QuIC 68
Figure 13 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196. 128
Figure 14 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 130
Figure 15 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 131
Figure 16 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 132
Figure 17 : Superposition de spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR de fibres PrPrec Δ190-196 133
Figure 18 : Spectres 2D DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 134
Figure 19 : Images AFM de PrPrec Δ190-196 montrant un cœur rigide entouré des parties flexibles. 135
Figure 20 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage scalaire de fibres de PrPrec Δ190-196. 136
Figure 21 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR et TOBSY des fibres de PrPrec Δ190-196. 137
Figure 22 : Zoom sur le spectre TOBSY de fibres de PrPrec Δ190-196 138
Figure 23 : Identification d'un système de spin d'alanine sur le spectre TOBSY de fibres Δ190-196. 139
Figure 24 : Suivi par fluorescence de la Thioflavine T de la formation de fibres de PrP Δ190-196 en absence de GdHCl, en fonction de la présence d'amorces 141
Figure 25 : Intensité de la fluorescence (ThT) des fibres de PrPΔ190-196 formées dans des conditions standards au bout de 16 h de réaction 142
Figure 26 : Suivi par fluorescence de la ThT de la formation de fibres de PrPΔ190-196 sous agitation 143
Figure 27 : Test des échantillons maturés au Triton et traités PK révélés avec l'anticorps C-term F99 145
Figure 28 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 C1 et pleine longueur 147
Figure 29 : Zooms sur spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 pleine longueur (vert) et C1 (rose). 149
Figure 30 : Spectre 1D ^{13}C « Refocused INEPT » de fibres de PrPrecΔ190-196 C1 mettant en évidence la présence de régions flexibles et mobiles. 150
Figure 31 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 de pleine longueur maturées et non maturées 151
Figure 32 : Zooms sur le spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 pleine longueur maturées et non maturées. 153
Figure 33 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire avec un temps de mélange de 25 ms de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées et traitées PK. 155
Figure 34 : Superposition de spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 non traitées et celles qui ont été maturées et traitées PK. 157
Figure 35 : Zooms sur le spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 pleine longueur non maturées et maturées traitées PK. 157
Figure 36 : Superposition de spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées avant et après traitement PK. 158

Tableau 1 : Propriétés physico-chimique de la PrP^{C} et la de PrP^{Sc} 38
Tableau 2 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres DARR de PrPrec Δ190-196. 129
Tableau 3 : Systèmes de spins trouvés pour le spectre DARR avec un temps de mélange 200 ms de fibres de PrPrec Δ190-196. 129
Tableau 4 : Systèmes de spins trouvés pour le spectre TOBSY de fibres de PrPrec Δ190-196 137
Tableau 5 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres PARIS de fibres de PrPrec 113-234 (C1) Δ190-196 148
Tableau 6 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées. 152
Tableau 7 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées et traitées PK 156
Tableau 8 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre DARR des fibres Δ190-196 de pleine longueur avec un temps de mélange de 25 ms 159
Tableau 9 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre DARR des fibres Δ190-196 de pleine longueur avec un temps de mélange de 200 ms 160
Tableau 10 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre TOBSY des fibres Δ190-196 de pleine longueur. 160
Tableau 11 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres C1 Δ190-196 avec un temps de mélange de 25 ms. 161
Tableau 12 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres Δ190-196 de pleine longueur maturées avec un temps de mélange de 25 ms. 161
Tableau 13 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres Δ190-196 de pleine longueur maturées et traitées PK avec un temps de mélange de 25 ms. 162

Liste des abreviations

AFM	Microscopie à force atomique
CD	Circular dichroism
CPD	Camel prion disease
CREB	C-AMP Response Element Binding
cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
CWD	Chronic Wasting Disease
DARR	Dipolar Assisted Rotational Resonance
ERAD	Endoplasmic reticulum associated degradation
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESF	Encéphalopathie spongiforme féline
ESST	Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IFF	L'Insomnie Fatale Familiale
iPSCs	induced pluripotent stem cells
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRTF	La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
kDa	KiloDalton
LB	Milieu de culture Luria Bertani broth
MAS	Magic angle spinning
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MCJs	La maladie de Creutzfeldt-Jakob de forme sporadique
MES	Acide 2-(N-Morpholino)-éthanesulfonique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
PARIS	Phase-Alternated Recoupling Irradiation Scheme
pb	Paire de base
PIRIBS	Parallel-in-register intermolecular beta sheet
PK	Protéinase K
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification
ppm	Partie par million

PrP	Protéine prion
PrP^{C}	Protéine prion cellulaire
PrP^{res}	Portion de la protéine prion résistante à la digestion par la protéinase K
PrP^{Sc}	Protéine prion « scrapie »
RE	Réticulum endoplasmique
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	rotation par minute
rsPMCA	PMCA région spécifique
SAXS	Diffusion de rayons X aux petits angles
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SNC	Système nerveux central
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
ThT	Thioflavine T
TNM	Tétranitrométhane
TOBSY	TOtal through Bond correlation SpectroscopY
UPR	Unfolded Protein Response
vMCJ	Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
WT	Wild type (de type sauvage)

I. Introduction

1. Les maladies à prion

1.1. Introduction aux maladies à prion.

Les maladies à prion ou Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible (ESST) sont des maladies neurodégénératives, infectieuses caractérisées par une longue phase d'incubation cliniquement silencieuse, sans réaction immunitaire détectable et ont toujours une évolution fatale sans rémission (Prusiner *et al*., 1982). Chez l'homme la maladie provoque une démence progressive et dans certain cas une ataxie cérébelleuse. L'examen post-mortem du cerveau montre une spongiose du neuropile, une perte neuronale et une gliose astrocytaire (Prusiner 1989).

La première ESST à avoir été décrite chez l'animal est la tremblante du mouton (scrapie), en 1732 en Europe. Sa transmissibilité a été démontrée en 1936 par deux vétérinaires français Cuillé et Chelle (Hauw *et al*., 2015). En 1954 Björn Sigurdsson propose le terme « slow virus » pour décrire l'agent infectieux responsable de la maladie notamment à cause de la longue phase d'incubation caractéristique des maladies à prion (Sigurdsson., 1954), 5 ans plus tard William Hadlow suggère que la tremblante du mouton et une autre ESST qui touche l'homme « le kuru » soient similaires (Hadlow., 1959). C'est J.S Griffith qui en 1967 proposa pour la première fois l'autoréplication d'une protéine seule, sans l'intervention de molécule d'ADN (Griffith *et al*., 1967). La thèse du virus devenait moins populaire au fur et à mesure que les informations sur l'agent infectieux s'accumulaient. Le poids moléculaire et les propriétés biochimiques de l'agent responsable des ESST ne correspondaient pas à ceux d'un virus. De plus l'infectivité de l'agent responsable des ESST pouvait être réduite par hydrolyse et modification des protéines mais restait résistante aux procédés altérant les acides nucléiques.
En 1982 S.B Prusiner proposa le terme prion formé des mots « Proteinaceous and infectious » pour désigner ce nouvel agent infectieux (Prusiner., 1982). Ensuite il fera la démonstration que

la protéine PrP^{Sc} une isoforme issue d'un repliement anormal de la protéine prion PrP^{C} est le seul agent responsable des maladies à prion (Prusiner., 1997).

1.2. Les maladies à prion animales.

1.2.1. La tremblante des petits ruminants.

Observée dés 1732 la tremblante des petits ruminants (moutons et chèvres) est la première ESST animale décrite, sa transmissibilité a été démontrée par les expériences des vétérinaires Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle *via* l'injection intracérébrale d'un broyat de cerveau provenant d'un animal malade à des moutons sains (Cuillé and Chelle 1936).

Le plus souvent les individus susceptibles à la maladie sont âgés de deux à cinq ans. La tremblante présente une longue phase d'incubation de 1 à 3 ans et une phase clinique relativement courte de 2 semaines à 6 mois. Les premiers signes cliniques consistent en un changement de comportement de l'animal qui présente une extrême nervosité ainsi qu'une tendance à se gratter et se frotter contre des objets fixes afin de soulager l'apparition de prurit extrême, d'où le nom de « scrapie » en anglais pour cette pathologie. L'évolution de la maladie mène à l'apparition de troubles moteurs (ataxie, tremblement) et visuels, une perte de poids ainsi que des difficultés respiratoires (dyspnée) et à une issue fatale.

Des études réalisées sur des cas infectés naturellement ou expérimentalement montrent une distribution précoce dans les organes lymphoïdes de la forme anormale de la PrP identifiée comme PrP « scrapie » (PrP^{Sc}), qui est l'agent responsable de la maladie. Au stade terminal la PrP^{Sc} peut être retrouvée dans plusieurs tissus ou liquides biologiques, les titres infectieux les plus élevés étant retrouvés dans le cerveau et les organes lymphoïdes (Detwiler et Baylis., 2003 ; Aguzzi et Sigurdson., 2004). La PrP^{Sc} est aussi présente dans le sang, le colostrum, le lait et le placenta ce qui explique pourquoi la contamination intra- et inter-espèce au sein des petits ruminants semble se faire principalement de la mère à sa progéniture (Lacroux *et al*., 2008 ; Andréoletti *et al*., 2002). La PrP^{Sc} a démontré une extrême résistance dans l'environnement, ainsi sa présence dans les fèces d'animaux naturellement infectés entraine la contamination des champs qui peuvent alors infecter un nouveau cheptel même après plusieurs années (Terry *et al*., 2011 ; Dexter *et al*., 2009).

La tremblante des petits ruminants ne semble pas représenter une menace directe pour l'Homme. En effet en dépit de plusieurs siècles d'exposition alimentaire aucune relation claire n'a pu être établie entre la tremblante des petits ruminants et des ESST humaines. Cette apparente absence de transmission zoonotique semble être due à un phénomène de barrière d'espèce qui limite naturellement la propagation des prions d'une espèce à une autre. Cependant une transmissibilité efficace de l'agent a été observée chez le singe marmouset et sur des souris qui surexpriment la PrP humaine. Ceci suggère la présence d'un potentiel zoonotique sollicitant une certaine vigilance (Baker *et al*., 1993 ; Cassard *et al*., 2014).

Le gène *Prnp* codant pour la PrP ovine influe fortement sur la susceptibilité des animaux vis-à-vis de la tremblante. Un polymorphisme existe aux positions 136 (A ou V), 154 (R ou H) et 171 (Q ou R) définissant cinq allèles (VRQ, ARQ, ARH, AHQ, ARR). Alors que l'allèle VRQ se traduit pour les souches les plus fréquentes par une plus grande sensibilité a la maladie, les individus hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle ARR sont résistants (Elsen *et al*., 1999). Cette relation entre la tremblante et le génotype PrP a entrainé la mise en place dans plusieurs pays dont la France, l'Angleterre et les États-Unis de programmes de sélections génétiques visant à promouvoir les animaux à génotype résistant et réduire le nombre d'animaux présentant un génotype sensible (Detwiler & Baylis, 2003). Cependant les moutons ARR restent sensibles à certaines souches naturelles dites atypiques comme la souche Nor98 décrite en 1998 en Norvège (Tranulis *et al*., 1999 ; Moum *et al*., 2005).

1.2.2. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) désignée couramment par « maladie de la vache folle » est une ESST décrite pour la première fois en 1986 au Royaume Uni (Brown *et al*.,2001). La maladie semble toucher préférentiellement les bovins jeunes avec une sensibilité accrue chez les individus âgés de 6 mois à 1 an, cependant bien que moins sensibles les animaux plus vieux peuvent contacter la maladie. Elle se caractérise par une période d'incubation d'une durée moyenne de 4,5 à 5,5 ans suivie d'une phase clinique définie par un changement de comportement, une ataxie des membres pelviens et une hyperesthésie aux stimuli auditifs, visuels ou tactiles. Une bradycardie et une réduction de la rumination sont souvent observées. Comme les autres ESST cette maladie aboutit à la mort de l'animal.

Chez les bovin domestique l'ESB ne semble pas se transmettre directement d'un individu a un autre. Contrairement à la tremblante le prion responsable de l'ESB présente une propagation périphérique moins importante en effet 90% du prion infectieux se trouve dans le cerveau et la moelle épinière chez les bovins cliniquement atteints. Il se réplique très peu dans les tissus lymphoïdes, de plus le lait et le placenta des animaux malades ne sont pas infectieux (Harman et Silva ., 2009).

Le prion responsable de cette maladie semble présenter une grande capacité à franchir la barrière d'espèce, ainsi l'ingestion de viande et d'abats de bovin contaminés par la BSE entraine sa transmission à l'homme provoquant un variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ). Elle peut aussi se transmettre à d'autres animaux comme les grands félins ou les chats domestiques (encéphalopathie spongiforme féline (ESF)) (Valleron *et al*., 2001)

Une grande épidémie d'ESB a eu lieu au Royaume Uni entrainant l'abattage d'environ 1 million de bovins et la mort d'environ 150 patients infectés (Prusiner., 1997 ; Andrews *et al*., 2003). Les données épidémiologiques suggèrent fortement un lien entre cette épidémie et la consommation de farines animales. Ces farines faites à partir de viande et d'os récupérés des carcasses de bovins et de moutons ont servi de compléments protéiques dans l'alimentation des bovins (Wilesmith *et al*., 1991). Cependant la résistance remarquable des prions aux procédures de décontamination et à la réduction de la température dans les procédés de fabrication dans les années 70 ont vraisemblablement permis au prion présent dans certaines carcasses contaminées de rester actif propageant ainsi la maladie (Deslys et Picot, 2001). À ce jour l'étiologie de la maladie reste incertaine l'agent responsable de l'ESB pouvant soit provenir de carcasse de moutons atteints de tremblante ou d'un cas spontané d'ESB.

En réponse à cette épidémie plusieurs mesures ont été mises en place pour contrôler la propagation de la maladie. Celles-ci incluent l'interdiction de l'utilisation de protéines de ruminants dans l'alimentation animal et des abas de bovin dans la chaine alimentaire, l'inscription de l'ESB dans les maladies à déclaration obligatoire, la mise en place de surveillance active et l'abattage systématique des troupeaux infectés, l'interdiction de la consommation des tissus les plus infectieux comme le cerveau, la moelle épinière, le thymus et l'intestin. (Valleron *et al*., 2001).

La mise en place de tests de dépistage systématique de l'ESB dans les carcasses de bovin a permis comme pour la tremblante la découverte de deux formes atypiques. Les deux formes sont observées sur des animaux âgés ce qui suggère une origine sporadique. La PrP^{Sc} correspondante à chacune de ces deux formes présente un profil électrophorétique en Western blot différents de celui de la forme classique ce qui permet de les discriminer. On distingue ainsi la forme L, pour « Low » dont la PrP^{Sc} possède un poids moléculaire inferieur à celui observé pour l'ESB classique et la forme H pour « High » qui a, inversement, une taille supérieure. La transmissibilité de la forme L a été démontrée chez les bovins, les primates non humains et sur des souris transgéniques suggérant un risque en termes de santé publique (Buschmann *et al.*, 2006 ; Lombardi *et al*. 2008 ; Comoy *et al*., 2008). La forme H semble moins préoccupante, l'évaluation du potentiel zoonotique de cet agent dans un modèle murin humanisé souligne l'absence de transmission de la maladie (Béringue *et al.*, 2008). Les caractéristiques de ces ESB atypiques sont conservées lors de leur transmission expérimentale a des souris transgéniques exprimant la PrP bovine. Leur propagation chez des souris transgéniques exprimant la PrP ovine (allèle VRQ) conduit à l'émergence d'un agent différent de l'ESB (Béringue *et al*., 2007).

1.2.3. Autres ESST animales :

La maladie du dépérissement chronique des cervidés de l'anglais Chronic Wasting Disease (CWD), est une ESST affectant les cervidés en captivités et sauvages. Les premiers cas ont été décrits en 1967 chez des cerfs captifs du Colorado, en 1996 la maladie s'est ensuite rependue au Canada au sein de cerfs d'élevage. Depuis 2000 on retrouve cette pathologie chez des animaux en liberté. À ce jour, c'est la seule ESST présente de façon naturelle chez des animaux sauvages. La phase clinique dure environ trois mois, les animaux malades présentent un amaigrissement, un dépérissement graduel et une salivation excessive (Mathiason *et al*. 2006). De nombreuses similitudes au niveau physiopathologique existent entre la CWD et la tremblante des petits ruminants, le prion responsable de la maladie est présent dans l'urine, les fèces, la salive, le sang et les bois (Waddell *et al*., 2017). La dissémination précoce de l'infection dans les organes périphériques semble favoriser la transmission rapide au sein du troupeau. (Kim *et al*., 2005). Les cervidés sont consommés en Amérique notamment par les chasseurs, bien qu'aucune donnée expérimentale publiée à ce jour n'ait démontré une transmission du prion responsable de la CWD à l'Homme la vigilance reste nécessaire surtout

qu'une transmission au singe écureuil (qui reste éloigné phylogénétiquement de l'Homme) par voie intracérébrale est possible (Race *et al*., 2014).

Plus récemment un nouveau prion a été décrit chez des dromadaires dans le sud-est algérien. La nouvelle maladie baptisé CPD pour « camel prion disease » a été découverte lors d'inspection ante-mortem de routine à l'abattoir de Ourgla en Algérie. La maladie n'est pas encore très bien décrite mais le fait que les 3 animaux identifiés provenaient tous d'un même abattoir ainsi que l'abondance de PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes qui sont souvent impliqués dans la transmission horizontale en condition naturelle, évoquent la nature infectieuse de la CPD. Ces observations suggèrent aussi une origine infectieuse plutôt que sporadique, une contamination par des farines animales contaminé par l'ESB ou par des moutons ou des chèvres atteints de la tremblante ne peut être exclue à ce jour. Les dromadaires sont répandus dans tout le nord et l'est de l'Afrique, au Moyen-Orient et dans une partie de l'Asie, où ils sont le moyen de subsistance de millions de familles qui vivent dans les écosystèmes les plus hostiles de la planète, la CPD représente donc un potentiel risque sanitaire et économique pour ces populations et nécessite une étude plus approfondie (Babelhadj *et al*., 2018).

1.3. Les maladies à prion humaines

Les maladies à prion existent aussi chez l'Homme, bien que ces maladies présentent des profils cliniques différents elles sont toujours progressives et mortelles. Elles se manifestent généralement par une démence, une ataxie cérébelleuse, des troubles du comportement et des myoclonies (Sikorska *et al*., 2012). Ce sont des ESST, elles sont le plus souvent transmissibles par inoculation à l'animal (souris transgéniques humanisées, singes ou lémuriens) ce qui les distingue des autres maladies neurodégénératives humaines. Les maladies à prion humaine peuvent être classées en trois catégories :

- La maladie de Creutzfeldt-Jakob de forme sporadique (MCJs)
- Les formes génétiques
- Les formes issues d'une infection

1.3.1. La forme sporadique

La forme sporadique est la plus répandue, elle représente plus de 80% des cas d'ESST humaine. Elle reste cependant une maladie rare avec une incidence annuelle de 1,67 par million d'habitants d'après des données de surveillance de MCJs regroupant l'Europe, l'Australie et le Canada. La MCJs touche préférentiellement les individus entre 45 et 75 ans (Glatzel *et al*., 2005 ; Ladogana *et al*., 2010), avec un âge médian de décès autour de 65 ans. Au niveau clinique les premiers signes peuvent s'apparenter à ceux d'une dépression, il s'en suit une démence a progression rapidement associée à une ataxie cérébelleuse, des troubles visuels et une myoclonie qui évolue vers un mutisme akinétique (Sikorska *et al*., 2012). La phase clinique est le plus souvent relativement courte et la personne atteinte décède en général dans les 2 à 6 mois suivant l'apparition des premiers signes cliniques.

L'origine de la forme sporadique de MCJ reste à déterminer. En effet il n'y a pas de lien établi entre la MCJs et une ESST animale ou une mutation du gène *PRNP* codant pour la protéine prion. Une première possibilité très plausible consisterait en un changement de conformation aléatoire et rare de la PrP^{C} aboutissant à la formation spontanée d'une PrP^{Sc}. Deux autres possibilités ne peuvent être écartées à ce jour consistant en une conversion provoquée par une mutation somatique du gène *PRNP* ou en une erreur de traduction au niveau d'un neurone.

Toutefois comme pour la tremblante des petits ruminants le gène *Prnp* semble jouer un rôle dans la sensibilité des individus a la maladie. Un polymorphisme très important existe à la position 129 pour la susceptibilité à ces maladies, en effet il a 72% de met/met dans les cas sporadiques alors qu'ils ne représentent que 41% dans la population générale. (http://www.creutzfeldt-jakob.aphp.fr/p_epidem_data.htm) (Palmer *et al*., 1991)

Le diagnostic de certitude d'une MCJs ne peut être posé qu'a la mort du patient via un examen neuropathologique. Au niveau macroscopique, l'examen du cerveau présente souvent différents degrés d'atrophie cérébrale qui ne sont cependant pas caractéristique des MCJs. C'est la présence de PrP résistante à la protéinase K (PK) qui est le marqueur le plus spécifique de la MCJ, mais l'examen du tissu cérébral au microscope permet de mettre en évidence la spongiose (présence de vacuole dans le neuropile de la matière grise) une perte neuronale et une gliose astrocytaire est aussi nécessaire pour établir le diagnostic (figure 1) (Sikorska *et al*., 2012).

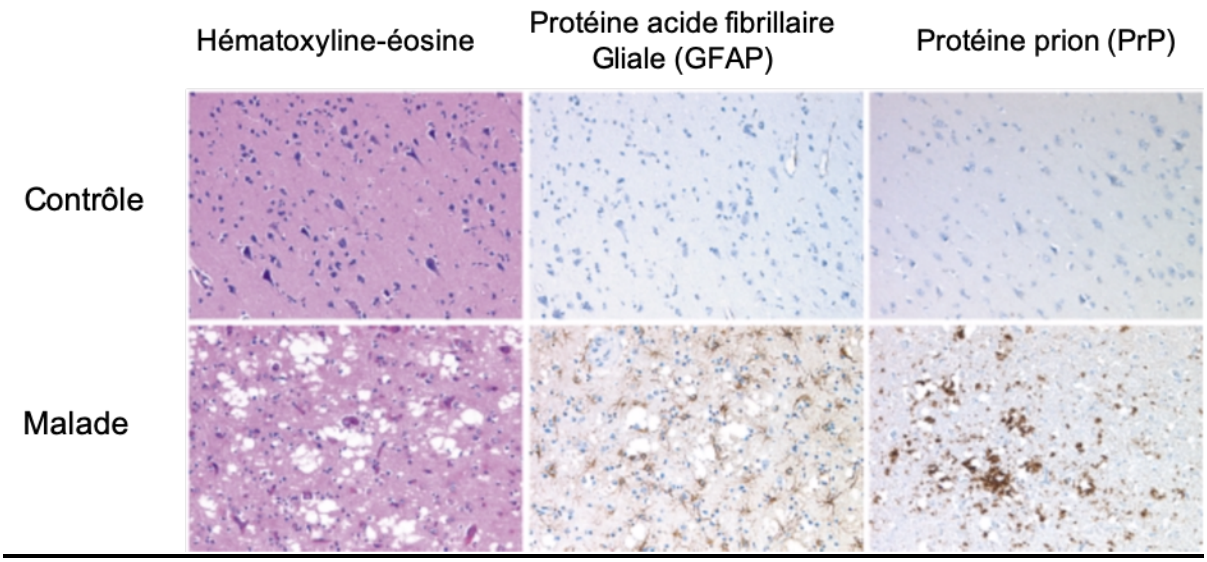

Figure 1 : Caractéristiques neuropathologiques d'une encephalopathie spongiforme (Beringue *et al*., 2017).

Observation de coupes de cortex frontal d'un patient décédé sans avoir contracté de maladie neurodégénérative (Contrôle) et d'un patient décédé de la maladie de Creuzfeldt-Jakob (Malade).
La spongiose est mise en évidence par coloration en hématoxyline éosine. L'activation astrocytaire est détéctable par une augmentation du marqueur GFAP. Les dépots anomaux de proteine prion (PrP) sont uniquement détéctés chez l'individus malade.

1.3.2. Les formes génétiques

A ce jour trois formes d'ESST humaines d'origine génétique sont connues : La forme génétique de la MCJ, le syndrome de Gerstmann- Sträussler-Scheinker (GSS) et L'Insomnie Fatale Familiale (IFF). Ces formes sont beaucoup moins répandues que la forme sporadique et ne représentent que 10-15% des cas de maladies à prions humaines. Elles sont liées à des mutations autosomales dominantes du gène *PRNP*.

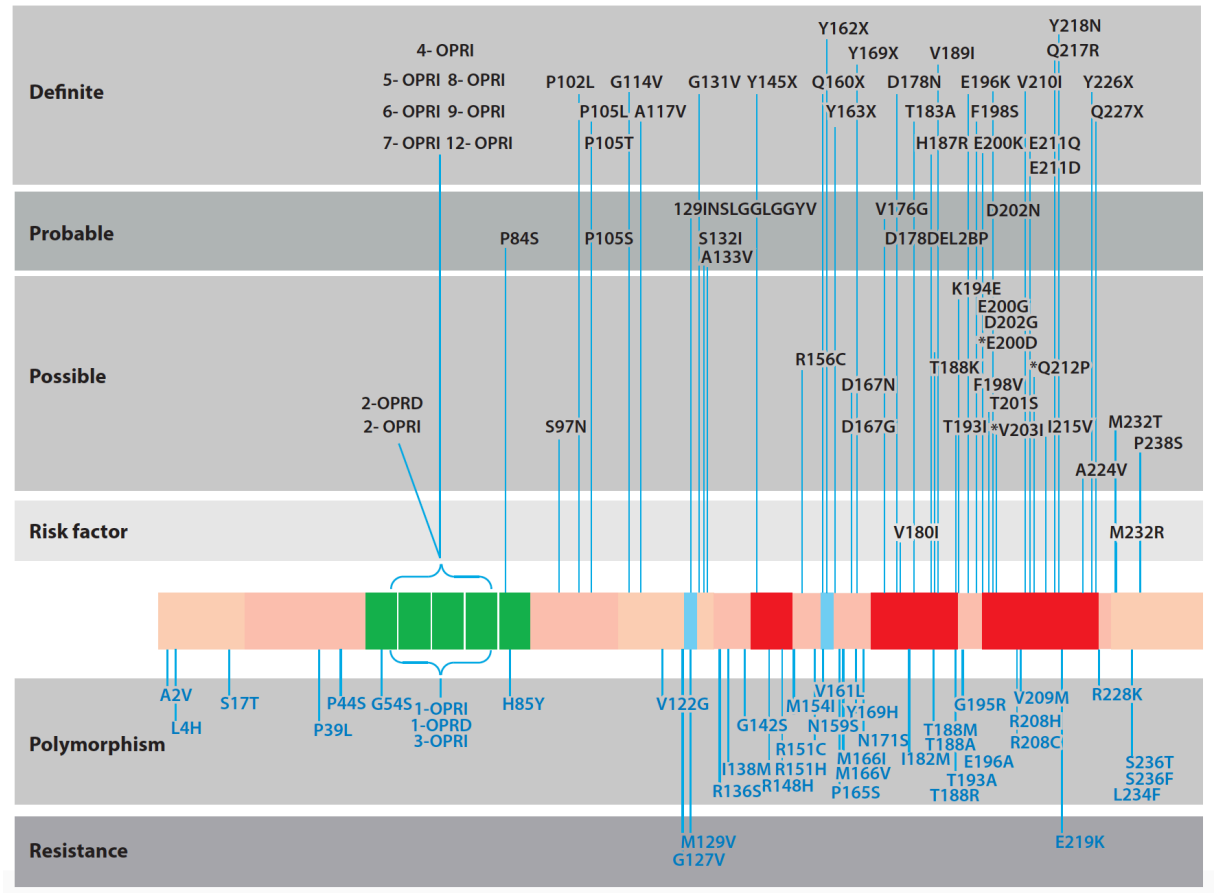

Figure 2 : Mutations et polymorphismes du gène *PRPN*. (Mead *et al*., 2019)
Soixante-deux mutations par substitutions, insertions, duplication partielle, délétions ou mutations non-sens, associées ou suspectées d'être associées aux maladies à prions sont indiquées au-dessus du schéma de la séquence PrP. En dessous sont indiqués les polymorphismes rencontrés dans les populations humaines ainsi que trois mutations associées à une certaine résistance au développement de la maladie.

1.3.2.1. La forme génétique de la MCJ :

La MCJ génétique présente certaines similarités cliniques, lésionnelles et biochimiques avec la forme sporadique de la MCJ, cependant contrairement à la MCJs elle est toujours liée à une mutation du gène *PRNP*. La mutation la plus fréquente est la substitution E200K qui représente 70% des cas de MCJ génétiques (Gambetti *et al*., 2003). Les autres mutations ponctuelles, plus d'une trentaine, sont réparties sur l'ensemble de la région codante avec un certain regroupement dans la région codant les hélices H2 et H3 de la partie C-terminal de la protéine (Mead *et al*., 2019). On trouve aussi des insertions ou délétions qui concernent surtout la région « octarepeat » de la partie N-terminale. Des familles avec des insertions de 6, 7, 8 ou même 9 octapeptides ont été décrites. Les délétions sont très rares, avec seulement deux rapportées à ce jour, également dans la région des répétitions des octapeptides (Lloyd *et al*., 2011).

1.3.2.2. Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) :

Le syndrome de GSS est une maladie héréditaire provoquant une neurodégénération lente du système nerveux centrale. La première famille porteuse de la maladie a été identifiée en Autriche par Dimitz en 1913 puis par Gerstmann une première fois en 1928 et une seconde fois par Gerstmann et Sträussle en 1936 (Liberski., 2018). La première mutation associée à une GSS est la substitution P102L de la PrP (Hsiao *et al*., 1989) d'autres mutations ont été décrites depuis aux codons 105, 117, 131, 145, 187, 198, 202, 212, 217 et 232. Dans certains cas la GSS peut être due à des insertions dans la région des cinq répétitions d'une séquence de huit acides aminés (aa 51-94) (Brown et Mastrianni., 2010). La maladie présente une évolution longue pouvant dépasser les 10 ans et apparait généralement vers l'âge de 40 ans. Le début de la maladie est souvent associé à une ataxie cérébelleuse suivie par des troubles cognitifs (Peoc'h *et al*., 2012), cependant le marqueur le plus spécifique de la maladie est visible au niveau histologique, en effet le syndrome est toujours associé à la présence de plaque amyloïdes multicentriques de PrP^{Sc} disséminées dans l'encéphale (Liberski., 2018). Le caractère infectieux de certains GSS a été entre autres démontré expérimentalement sur des singes marmouset (Baker *et al*., 1990).

1.3.2.3. L'Insomnie Fatale Familiale :

L'insomnie fatal familiale (IFF), est une ESST décrite pour la première fois en Italie en 1986. C'est une maladie rare due elle aussi à une mutation ponctuelle dans le gène *PRNP,* une substitution D178N associée sur le même allèle a la présence d'une méthionine au codon 129. L'âge moyen de début d'apparition des symptômes est de 50 ans, l'IFF se caractérise par une perturbation du système nerveux autonome et une insomnie rebelle aux traitements et pour laquelle le sommeil lent profond n'est pas atteint (Appleby *et al*., 2010 ; Jackson *et al*., 2009), mais aussi des hallucinations, des troubles neurovégétatifs, des difficultés motrices et une démence qui peut être tardive (Cortelli *et al*., 1999). La maladie continue d'évoluer entrainant la mort dans les 1-2 ans suivant l'apparition des signes cliniques (Collinge *et al*., 1995). Dans l'IFF la vacuolisation est faible ou absente, la PrP^{Sc} est présente dans des régions spécifiques et en faible quantité, les régions les plus concernées étant le thalamus et le lobe temporal du cerveau (Brown et Mastrianni, 2010 ; Jackson *et al*., 2009). Il existe aussi quelques très rares cas d'IFF sporadique, sans mutation du gène.

1.3.3. Les formes infectieuses

1.3.3.1. Le Kuru :

Décrite pour la première fois en 1957 et considérée à ce jour comme la seule épidémie humaine liée au prion, le Kuru a touché le peuple Foré de Papouasie-Nouvelle-Guinée et de façon moins importante des tribus voisines suite à des mariages avec les Foré (Gajdusek & Zigas, 1957 ; Will., 2003). Le nombre total de cas enregistré dépasse les 3000 individus et concerne majoritairement des femmes et des enfants. L'étude moléculaire et neuropathologique de la maladie suggère fortement que le kuru provient d'un individu atteint de MCJs et a été ensuite propagé via la consommation d'organes infectés durant des rites funéraires cannibales. Durant ce rituel entrepris comme une marque de respect et de deuil envers la personne décédée les viscères et le cerveau, hautement infectieux sont consommés par les femmes et les enfants alors que les muscles, faiblement infectieux, sont réservés aux hommes (Wadsworth *et al*., 2008 ; Whitfield *et al*., 2008). Il ne semble pas y avoir de transmission verticale car ni les enfants nés de mères malades ni ceux nés après l'interdiction des rituels en 1956 n'ont contracté la maladie.

La phase clinique se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive et la présence d'une démence qui contrairement aux MCJs est tardive et moins importante (Collinge *et al*., 2008). Comme pour beaucoup d'autres ESST humaines le polymorphisme à la position 129 joue un rôle. Ce polymorphisme représente un facteur de susceptibilité important dans le développement et la durée d'incubation de la maladie (Mead *et al*., 2003), ainsi les individus homozygotes MM sont plus sensibles que les individus VV et MV (Mead *et al*., 2009). La transmissibilité du Kuru a été mise en évidence expérimentalement sur des chimpanzés dès 1966, les caractéristiques cliniques et neuropathologiques ont permis alors d'établir un premier lien avec la tremblante des petits ruminants (une ESST animale) (Gajdusek, Gibbs, et Alpers, 1966).

1.3.3.2. Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob :

Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob vMCJ a été décrit pour la première fois au Royaume Uni en 1996. Il s'agit d'une ESST humaine qui se caractérise par des atteintes psychiatriques associées à des phases de dépression et d'hallucination, une longue phase clinique d'environ 14 mois et la présence dans le cerveau des malades de plaques composées

d'agrégats de PrP^{Sc} entourées d'une couronne de vacuoles (Glatzel *et al*., 2004 ; Ironside., 2010 ; Will *et al*., 1996). Les études épidémiologiques ont rapidement établi une corrélation entre l'épidémie d'ESB (une ESST animale) qui a eu lieu essentiellement au royaume uni dans les années 80, mais également en France dans une moindre mesure, et l'apparition de cette nouvelle forme de maladie humaine, suggérant que les deux étaient liées (Collinge *et al*. 1996). Cette hypothèse a été confirmée en autre par la transmission expérimentale de l'agent causant l'ESB aux macaques cynomolgus qui présentent des atteintes neuropathologiques caractéristiques de la vMCJ (Lasmézas *et al*., 1996). L'infection de souris sauvages avec l'ESB et de la vMCJ suggère des caractéristiques de souche similaires (Bruce *et al*. 1997). Ces données vont dans le sens d'un franchissement de la barrière d'espèce bovin-Homme par le prion responsable de l'ESB, l'origine la plus probable de la MCJv est donc due à la consommation de produits d'origine bovine contaminés par l'ESB.

Contrairement à beaucoup d'autres ESST humaines le vMCJ présente une distribution périphérique importante de PrP^{res}, notamment dans les tissus lymphoïdes durant la phase tardive de la maladie. Cette propriété est souvent associée à une plus grande infectiosité du prion, qui a été confirmée par la mise en évidence de cas de transmission d'Homme à Homme lors de transfusions sanguines. Les malades ont contracté la maladie entre 6,5 ans et 8 ans après avoir reçu le sang contaminé (Ironside, 2010).

1.3.3.3. Les accidents iatrogènes :

Cette forme rare fait référence à des transmissions accidentelles de MCJ d'humain à humain durant des interventions médicales (Glatzel *et al*., 2005). Plusieurs cas ont été identifiés notamment des contaminations lors de greffes de cornée ou de dure-mère humaines contaminées par les prions, l'injection d'hormone de croissance extraite d'hypophyse de cadavre humain atteints de MCJ qui a eu lieu en France dans les années 80 en faisant 160 victimes et la réutilisation d'instruments chirurgicaux contaminés après leur utilisation sur des patients atteints de MCJ. Le site et la voie d'inoculation semble avoir un impact direct sur le temps d'incubation de la maladie. En effet l'exposition intracérébrale directe aux prions et l'implantation d'une dure-mère contaminée par des prions sont associées à de courtes périodes d'incubation (16 à 28 mois), tandis qu'une exposition périphérique conduit à des temps d'incubation plus longs pouvant aller de 5 à 30 ans avec une phase asymptomatique. Encore une fois le polymorphisme a la position 129 impacte la maladie, les individus homozygotes 129

(MM) sont plus susceptible et/ou développent la maladie plus rapidement (Edgeworth *et al.*, 2011).

2. La protéine prion cellulaire

2.1. Gènes et expression de la PrP^C

2.1.1. Le gène *Prnp*

La protéine prion ou PrP est une sialoglycoprotéine membranaire hautement conservée chez les mammifères avec plus de 80% d'homologie pour la séquence protéique de la partie mature de la protéine entre les différentes espèces (Oesch *et al.*, 1991). La PrP est encodée dans le gène *Prnp*, un gène situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme, le chromosome 2 chez la souris et le chromosome 13 chez les ovins et bovins. Le gène est composé de 2 exons chez l'homme et le hamster mais de 3 exons pour la souris, les bovins et les ovins (Robakis *et al.*, 1986 ; Sparkes *et al.*, 1986 ; Lee *et al.*, 1998). Le cadre de lecture ouvert est contenu en entier dans un seul exon, le dernier. Il n'y a pas d'épissage alternatif possible qui puisse entrainer des modifications dans la structure primaire de la protéine (Basler *et al.*, 1986).

Prnp appartient à une famille de quatre gènes dont trois sont regroupés sur un même segment chromosomique (Figure 3) (Harrison., 2010 ; Makrinou *et al.*, 2002). Le deuxième gène *Prnd* se trouve entre une dizaine et une cinquantaine de kilobases en aval du locus *Prnp* selon les espèces. Il semble être le résultat d'une duplication partielle et d'un remaniement de la région génomique. *Prnd* contient la séquence codante pour Doppel, une protéine qui ne présente que 25% d'homologie avec la PrP. En effet Doppel ressemble à une PrP qui aurait perdu sa partie N-terminale flexible tout en conservant une organisation structurale qui rappelle celle de la région globulaire C-terminale de la PrP avec la présence de 3 hélices alpha. A une dizaine de kilobases en aval de *Prnd* se trouve un troisième locus, *Prnt* , chez l'homme et les ruminants, mais il est absent chez la souris. Parfois considéré comme un pseudogène dérivé de *Prnd*, on sait maintenant que *Prnt* permet l'expression de la protéine Prt, même si la taille de cette protéine est sensiblement différente chez l'homme et les ruminants. Le quatrième gène de cette famille, *Sprn*, qui contient la séquence codante pour la protéine Shadoo, est lui situé sur un autre chromosome que les trois autres membres de cette famille. Shadoo présence des

similitudes seulement avec la partie NH2-terminale non structurée de la PrP et ne possède pas de domaine globulaire contenant des hélices alpha (Allais-bonnet et Paihoux., 2014).

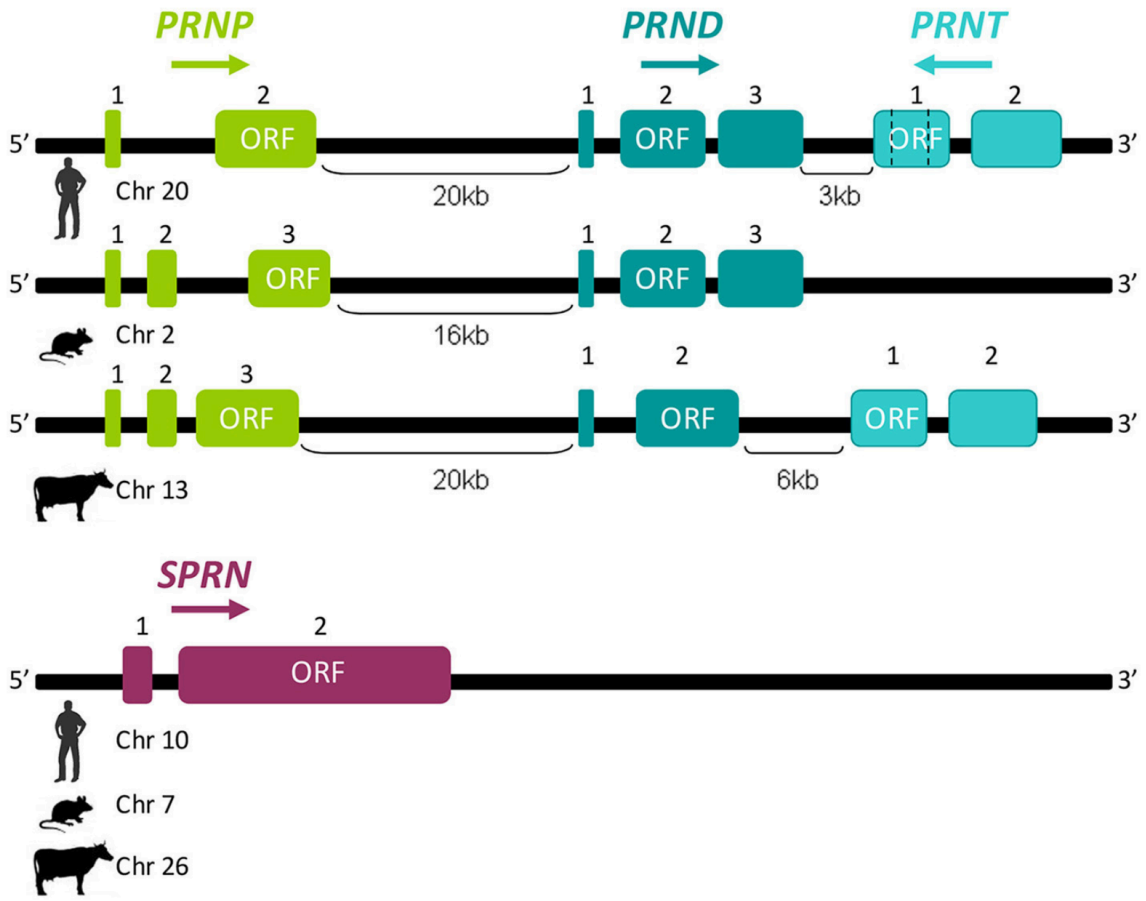

Figure 3 : Localisation chromosomique et organisation des gènes de la famille prion. (Allais-Bonnet et Pailhoux., 2014)

Les protéines Shadoo (Sho) et Doppel (Dpl) peuvent donc être assimilées à des homologues respectivement des domaines N- (flexible) et C- (globulaire) terminaux de la PrP^{C}, elles possèdent toutes les trois une ancre GPI et sont exprimées à la surface des cellules (Mays *et al*., 2014). Par contre si Sho et PrP sont fortement exprimées dans le tissu nerveux et jouent un rôle dans le cerveau (Watts *et al*., J 2007), Dpl mais aussi Prt sont quant à elles exclusivement exprimées dans les gonades et Prt est uniquement cytoplasmique (Pimenta *et al*., 2012 ; Allais-Bonnet *et al*., 2016). Ces protéines ont des interactions complexes entre elles. L'expression de Dpl dans le cerveau de souris $PrP^{0/0}$ induit une neuropathologie qui est inhibée par l'expression de la PrP. Le double « knock-out » de Sho et de PrP pourrait induire des perturbations du développement embryonnaire, voire une certaine létalité (Daude *et al*., 2012, Castille *et al*.,

2021). Par ailleurs l'expression de Sho est diminuée dans les maladies à prion et Sho et PrP pourrait interagir entre elles (Jiayu *et al*., 2010 ; Ciric *et al*., 2015, Westaway *et al*., 2011)

2.1.2. Expression de *Prnp*

Chez la souris, par hybridation in situ on a pu montrer que le gène *Prnp* commençait à être transcrit dans la membrane extra embryonnaire dès le stade embryonnaire E6. Pour l'embryon de souris une expression précoce a été détectée dès le 7,5ème jour après la fécondation (stade embryonnaire E7,5) correspondant à la formation du tube neural au niveau de la crête neurale. Dès le 13,5ème jour après la fécondation des transcrits peuvent être détectés dans les cellules neuronales et non neuronales chez l'embryon de souris (Manson *et al*., 1992)

Chez l'adulte le gène *Prnp* est essentiellement exprimé de façon ubiquitaire avec des taux d'ARNm très élevés dans le système nerveux central et périphérique. Le niveau d'expression varie selon les organes et les types cellulaires et il semble qu'il y ait une bonne corrélation entre les niveaux d'ARNm et ceux de la PrP exprimée (Linden *et al*., 2008).

La PrP^C est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et de façon majoritaire dans le système nerveux central. Son niveau d'expression varie en fonction des régions du cerveau et du type cellulaire. Par exemple, elle est fortement exprimée dans la substance grise du cortex, du striatum et de l'hippocampe mais plus faiblement dans le thalamus (Barmanda *et al*., 2004).

La PrP^C est détectée dans une variété de tissus périphériques tels que les organes lymphoïdes. Elle est exprimée dans les cellules du système immunitaire a des taux qui varient selon le type cellulaire et l'état d'activation, cette expression semble jouer un rôle dans la propagation des prions dans l'organisme (Zhang *et al*., 2020). La PrP^C est également retrouvée dans la circulation sanguine chez l'Homme, les bovins et les moutons. On la détecte aussi dans la rate, les reins, les poumons et les glandes surrénales (Horiuchi *et al*., 1995).

2.2. Traduction et modifications post-traductionnelles

2.2.1. Biosynthèse, maturation et dégradation

La synthèse de la PrP^C de façon générale est comparable à celle d'autres protéines à ancrage GPI. Durant sa synthèse dans le réticulum endoplasmique (RE) , la PrP acquière son repliement et subit des modifications post-traductionnelles qui incluent l'élimination du peptide signal N-terminal, la formation d'un pont disulfure entre les résidu Cys182 et Cys 217 (PrP^C ovine) qui permet de maintenir les deux hélices H2 et H3 rapprochées stabilisant ainsi la structure et la coupure du peptide signal C-terminal permettant l'ajout de l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (Mangé *et al*., 2004 ; Stahl *et al*., 1987 ; Turk *et al*., 1988). La protéine dont le repliement correct est vérifié par le système ERAD (pour endoplasmic reticulum associated degradation) est ensuite exporté vers l'appareil de Golgi où des chaînes N-glycanes complexes pourront être synthétisées au niveau des deux sites optionnels de glycosylation (Rudd *et al*., 2001 ; Vagin *et al*., 2009). La PrP^c est ensuite adressée à la membrane plasmique et retenue sur la face externe de la membrane cellulaire grâce à son ancre GPI (Caughey *et al*., 1989).

La PrP^C est internalisée par endocytose pour être soit recyclée soit dégradée dans les lysosomes par les protéases. Certains auteurs suggèrent que l'endocytose de la PrP dépend entièrement des cavéoles, c'est à dire d'invaginations de la membrane plasmique dépourvues de clathrine et qui sont généralement responsables de l'internalisation de protéines à ancrage GPI. D'autres auteurs proposent une endocytose par vésicules de clathrine (Shyng *et al*., 1994 ; Vey *et al*., 1996). Il est possible que l'une des deux voies soit préférée selon le type cellulaire ou que les deux coexistent au niveau d'une même cellule (Fivaz *et al*., 2002). En plus des mécanismes d'endocytoses constitutives il a été observé que l'exposition de cellules neuronales à une concentration d'ion Cu^{2+} de l'ordre de celle retrouvée naturellement dans le cerveau entraine une endocytose de la PrP^C (Taylor et Hooper., 2006).

2.2.2. Glycosylation

Une des modifications importantes de la PrP est sa glycosylation. La protéine possède deux sites optionnels de N glycosylation. Le premier est situé sur l'hélice H2 et le deuxième dans la boucle reliant les hélices H2 et H3. C'est usuellement dans le réticulum lors de la traduction de la protéine qu'un premier résidu sucre est fixé par l'oligosaccharyl transférase sur l'asparagine du site de glycosylation, puis au niveau du Golgi ce premier sucre est remplacé par une chaîne N-glycane complexe. Pour la PrP ovine les deux asparagines concernées sont Asp 184 et Asp 200. Leur glycosylation étant optionnelle on retrouve naturellement dans les cellules des formes de la PrP mono, bi et non glycosylées, a des proportions différentes. Plus de 50 compositions différentes de chaines glycanes avec des tailles et poids moléculaires plus ou moins importants ont été trouvées associée à la PrP (Rudd *et al*., 2021). Malgré ces différents degrés de glycosylation les différentes formes (non, mono et bi) peuvent généralement être identifié par western blot et la variabilité des chaîna N-glycanes expliquent le large signal correspondant à la forme biglycosylée de la PrP observée en western blot particulièrement dans les cellules RK13 (Lawson *et al*., 2005 ; Vilette *et al*., 2001, Moudjou *et al*., 2004). D'une manière générale la proportion de PrP non glycosylée est très faible et la PrP peut être considérée comme étant essentiellement une glycoprotéine. La glycosylation est très importante, voire essentielle pour l'adressage de la PrP à la surface des cellules (Salamat *et al*., 2011 ; Cancellotti *et al*., 2005). Les questions concernant l'importance de la glycosylation pour la conversion en prion ou le déterminisme de souche ont suscité de nombreux travaux, actuellement son implication ne parait pas majeure pour la conversion *in vitro* (Chapuis *et al*., 2016).

2.2.3. Coupures protéolytiques de la PrP cellulaire

Une fois traduite la PrP^{C} peut subir certaines coupures enzymatiques par des métalloprotéases de la famille ADAM. La plus importante est la coupure alpha qui a lieu entre les résidus 110/111 ou 111/112 chez l'homme (Figure 4B) (Chen *et al*., 1995 ; Vincent *et al*., 2000 ; Watt *et al*., 2005), cette coupure physiologique permet la formation d'un fragment amino-terminal soluble N1 qui semble avoir un effet anti-apoptotique et d'un fragment carboxy-terminal C1 qui reste lié à la membrane *via* son ancre GPI (Chen *et al*., 1995). Ce fragment C1 retrouvé en grande quantité dans le cerveau humain est décrit comme n'étant pas convertible en PrP^{Sc} probablement car il est de taille inférieure à celle des fragments prions résistants aux protéases. C1 est même usuellement considéré comme un inhibiteur dominant négatif de la conversion de

la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Corda *et al*., 2018) même si cette appréciation ne s'appuie que sur des indications indirectes et discutables (Westergard, *et al*., 2011; lewis *et al*., 2009).

Dans des conditions de stress oxydant la PrP^{C} peut subir une coupure au niveau d'un autre site noté bêta pour le distinguer du précédent et qui se situe autour du résidu 90 (Figure 4C). Cette coupure de la PrP cellulaire produit un fragment amino-terminal N2 et un fragment carboxy-terminal C2. Le fragment C2 naturel est usuellement très peu représenté et son rôle est mal connu. Il est sensible aux protéases mais coïncide avec la région des prions résistante à la protéinase K (29).

Une coupure gamma dont résulte un fragment carboxy-terminal C3 de 6-7 kDa a récemment été décrite. Ce fragment détecté dans des cerveaux d'humains et d'animaux est lui aussi un fragment C-terminal qui ne semble pas glycosylé mais possède l'ancre GPI (Lewis *et al*., 2016).

Finalement La PrP^{C} peut être clivée au niveau des résidus 227 et 228 par la metalloprotéase ADAM10 (Figure 4D) (Jarosz-Griffiths *et al*., 2019), libérant ainsi la protéine de la membrane. La coupure déleste la PrP de la cellule d'où l'appellation de « *shedding »* (Brochelt *et al*., 1993).

Les formes clivées de la PrP sont retrouvées avec des proportions différentes selon les régions du cerveau qu'il s'agisse de sujet sains ou malades.

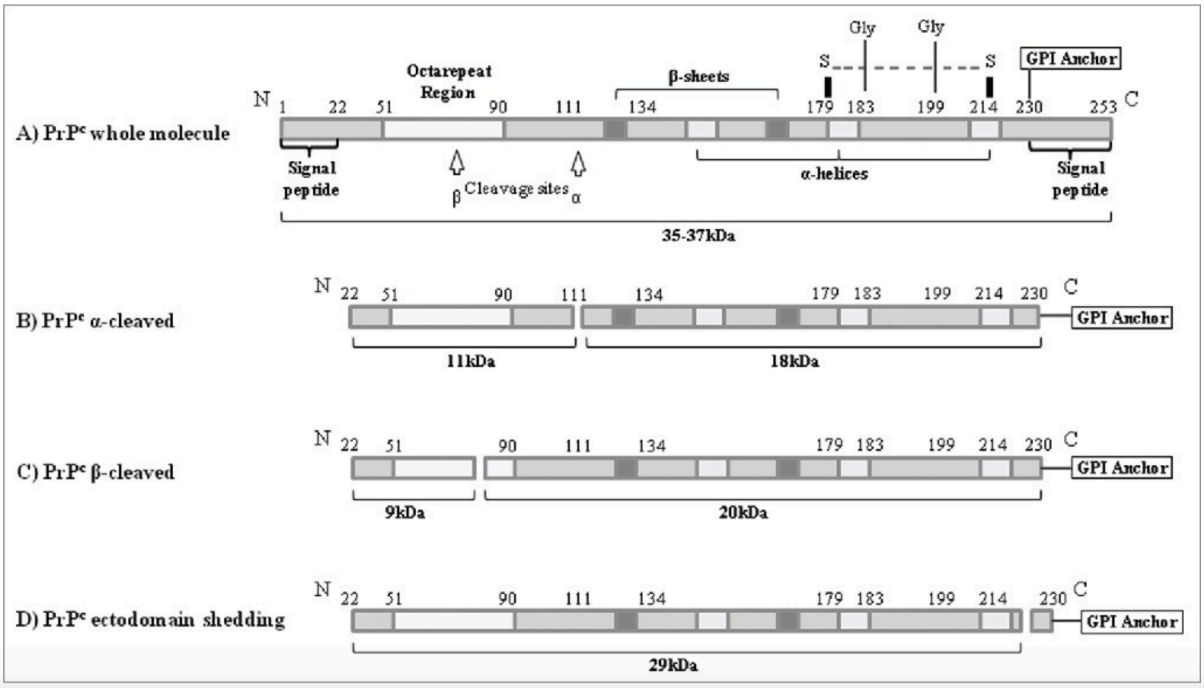

Figure 4 : Représentation de 3 coupures protéolytiques de la PrP cellulaire (Atkinson *et al*., 2016).
A) Représentation schématique de l'ensemble de la protéine prion cellulaire.
B) La coupure physiologique alpha qui a lieu entre les résidus 110/111 ou 111/112 chez l'homme, elle permet la formation d'un fragment amino-terminal soluble N1 et d'un fragment carboxy-terminal C1 qui reste lié à la membrane *via* son ancre GPI.
C) La coupure bêta qui a lieu autour du résidu 90 dans des conditions de stress oxydant induit la formation d'un fragment amino-terminal N2 et un fragment carboxy-terminal C2.
D) Libération de la PrPc entière : phénomène de « *shedding* ».

2.3. Structure de la PrP^{C}

La protéine PrP mature est constituée de 208 ou 210 résidus (23-230 ou 25-234, respectivement chez l'homme et le mouton). La structure a haute résolution des PrP recombinantes correspondantes a été établie par spectroscopie RMN, d'abord pour les PrP de souris et de hamster (Riek *et al*., 1996 ; Donne *et al*., 1997), les deux principaux modèles d'infection à prion utilisés alors, puis pour la PrP recombinante humaine (Zhan *et al*., 2000) et ensuite pour de nombreuses autres espèces de mammifères (Lysek *et al*., 2005). La cristallographie a été aussi utilisée pour établir la structure de la PrP de certaines espèces comme notamment le mouton (Eghiaian *et al*., 2004). Tout comme pour sa séquence, la structure de la PrP est très conservée chez les mammifères, même si quelques particularités ont été détectées (Rheede *et al*., 2003). Pour les espèces non mammifères étudiées la PrP présente aussi une organisation globale en alpha hélice rappelant celle des mammifères (Calzolai *et al*., 2005).

La PrP s'organise en deux domaines, un domaine N-terminal intrinsèquement désordonné et un domaine globulaire structuré et compact avec peu de boucle entre les différentes structures secondaires. A la jonction des deux domaines se trouve une région flexible et hydrophobe de 20 acides aminés riche en alanine et glycine dont le haut degré de conservation pourrait signifier un rôle majeur. Notamment sa délétion provoque une neurotoxicité *in vivo,* différente de celle d'une maladie à prion et non reliée à une transconformation de la protéine

La partie N-terminale comprend une séquence polybasique qui serait impliquée dans l'endocytose de la protéine, ainsi qu'une région riche en glycines et prolines qui contribue à la flexibilité de la partie N-terminale, cette région très conservée correspondant à 5 répétitions imparfaites d'une séquence octapeptide consensus (PHGGGWGQ), cette séquence est connue pour fixer le cuivre et également d'autres ions métalliques, mais avec une affinité moindre. Des études ont mis en évidence par RPE (résonance paramagnétique électronique) que les ions Cu2+ se fixent au niveau des histidines avec une forte affinité et que cela est coordonné par les amides des deux glycines qui les suivent.

Le domaine C-terminal globulaire comprend 3 hélices alpha (H1 144-154, H2 173-194 et H3 200-228) et deux brins courts formant un feuillet beta antiparallèle (ß1 128-131 et ß2 161-164), des boucles flexibles plus au moins longues reliant les différentes structures secondaires. La boucle reliant le brin ß2 et l'hélice H2 semble importante car sa structure est modulée par des modifications qui surviennent sur des parties éloignées de la protéine notamment au niveau de l'hélice H3. Un pont disulfure relie les hélices H2 et H3 (au niveau des cystéines 182-217 chez le mouton), ce pont disulfure permet de restreindre la variabilité structurale dans cette région de la protéine, sa suppression entraine le dépliement de la protéine qui devient alors plus susceptible d'être ciblée pour la dégradation (Figure 5).

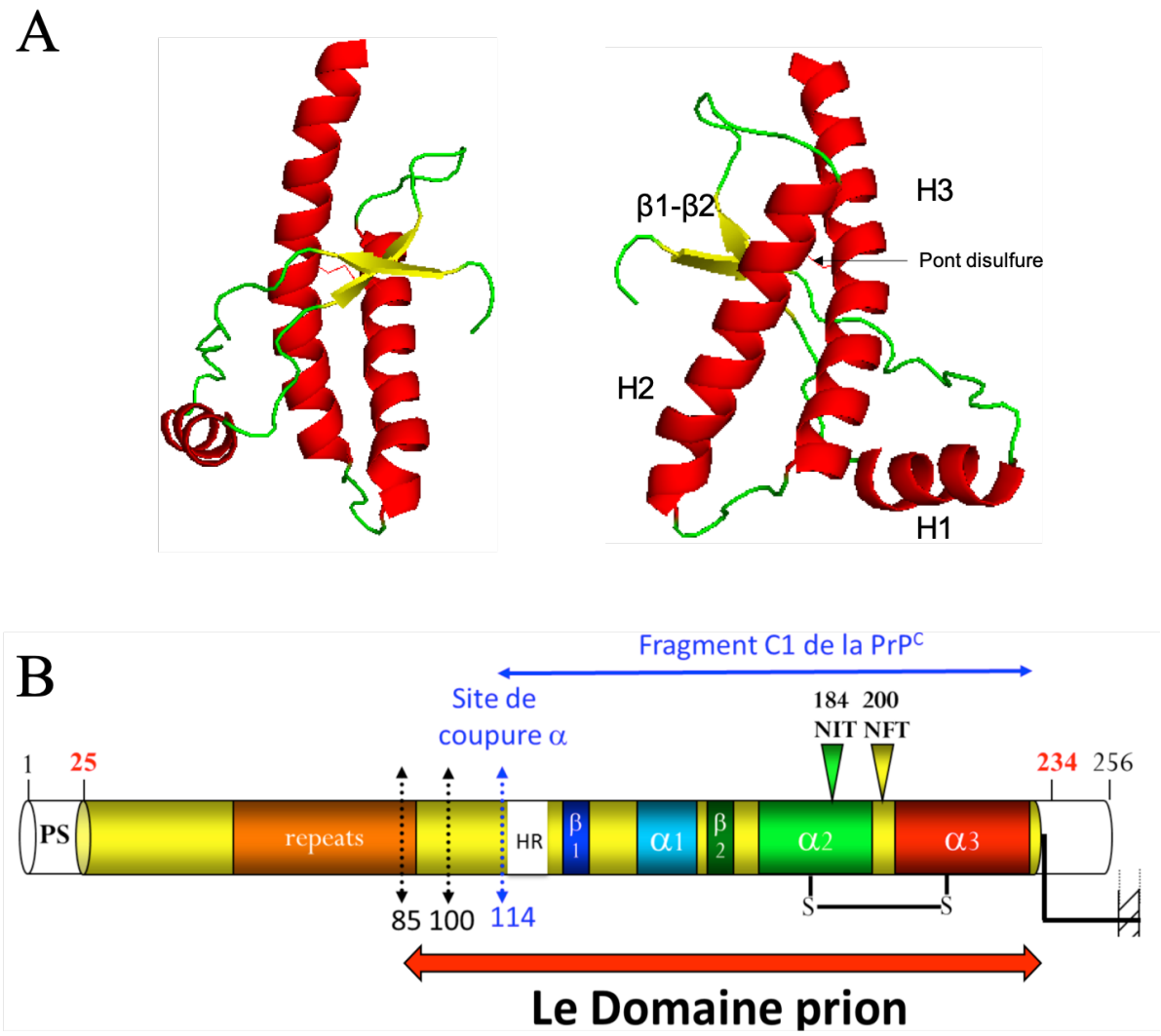

Figure 5 : Structure de la PrP^C

A) Structure tridimensionnelle de la PrP^C. Entrée 1QLX de la PDB.

B) Représentation Schématique de la PrP^C ovine.

Comme décrit précédemment ce domaine comprend aussi deux sites de glycosylation optionnel au niveau de deux asparagines la première située sur l'hélice H2 et la deuxième au niveau de la boucle reliant H2 et H3 (Asn 184 et Asn 200 chez le mouton). Bien que la PrP soit majoritairement retrouvée sous forme bi-glycosylée une analyse de PrP cellulaire extraite de tissus ou de cellules en culture permet de distinguer les trois formes bi- mono- et non glycosylées (Ermoval *et al.*, 2003). Les chaines de glycanes sont hautement hétérogènes, 60 différentes structures de glycanes ont été décrites. L'effet de ces glycanes sur la PrP a été étudié soit par l'étude de mutants soit par simulation de dynamique moléculaire. Le profil de glycosylation semble affecter l'adressage de la PrP, ainsi l'expression de la PrP non glycosylée dans des neurones de souris provoque une accumulation de la protéine dans le golgi mais sans

que cela n'entraine de neurodégénérescence. Cependant il est difficile de déterminer si ces résultats dépendent des mutations ou de la modification du profil de glycosylation. L'effet éventuel de la glycosylation sur la structure de la protéine a aussi été examiné, une étude comparative entre une PrP extraite de cerveau de bovin et une PrP recombinante montre que la glycosylation n'a que peu d'effet sur la structure globale et la stabilité de la protéine (Hornemann *et al*., 2004).

La fixation du cuivre semble avoir un effet sur la structure de la PrP. En plus des sites de fixation situés dans la partie flexible il semble que le cuivre soit aussi fixé ailleurs que dans la région octapeptide notamment au niveau des résidus His111 et His96. Cette fixation qui a été mise en évidence par dichroïsme circulaire semble d'après les travaux de Thakur (Thakur *et al*., 2011) promouvoir des interactions entre les deux domaines N et C-terminaux augmentant ainsi la compaction de la protéine.

2.4. Les différentes fonctions de la PrP^C

La grande variété des partenaires de la PrP cellulaire suggère non pas un mais plusieurs rôles physiologiques qui sont encore à ce jour mal définis (Gavín *et al*., 2020). Bien que l'étude de modèles murins invalidés pour le gène *Prnp* montre que ces animaux ont un développement normal, et ne présentent que des dysfonctionnements mineurs (Tobler *et al*., 1996 ; Tobler, Deboer et Fischer., 1997 ; Manson *et al*., 1995), ces études ont été réalisées sur des lignées *Prnp*-/- générées à partir de cellules souches embryonnaires de la lignée murine 129, puis généralement croisées avec d'autres lignées murines. Ces croisements entrainent des modifications du fond génétique des souris PrP nulles ce qui peut interférer avec les observations phénotypiques et compliquer leurs interprétations voire conduire à des conclusions erronées. Récemment une nouvelle lignée knock out $PrP^{0/0}$ avec fond génétique identique à celui des souris normales $Prnp^{+/+}$ a permis une interprétation plus fiable des données comparatives et la confirmation d'un des rôles majeurs de la PrP :

2.4.1. Rôle de la PrP dans la myélinisation

L'équipe d'Adriano Aguzzi a mis au point une nouvelle lignée murine déplétée en PrP^C en utilisant des enzymes de restriction TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) sur des oocytes murins fertilisés de la lignée C57BL/6J (Nuvolone *et al*., 2016). Une nouvelle

lignée appelée Zurich-3 (ZH3) a ainsi été créée, et elle est strictement co-isogénique à la lignée C57BL/6J. L'étude de cette lignée ZH3 montre qu'à partir de 14 mois les souris ont une diminution significative de la densité axonale au niveau des nerfs sciatiques, comparativement à la lignée sauvage et développent une polyneuropathie démyélinisante chronique. Cet effet sur la myélinisation a été observé en tout dans 5 lignées de souris déficientes en PrP^C générées par plusieurs laboratoires, y compris dans la lignée ZH3. Ces résultats suggèrent fortement un rôle physiologique de la PrP dans le maintien de la myéline périphérique. D'après des études réalisées *in vivo* et *in vitro* il semble que le fragment N-terminal de la PrP obtenu après coupure soit nécessaire à cette myélinisation, son action a été mise en évidence dans les cellules de Schwann via son interaction avec le récepteur couplé aux protéines G Gpr126. L'éventualité que le fragment N-terminal puisse transmette un signal de pro-myélinisation via une interaction avec d'autres récepteurs reste cependant possible (Wulf *et al.*, 2017).

2.4.2. Rôle neuroprotecteur de la PrP

Dans un modèle de souris transgénique soumis à une ischémie cérébrale, des lésions plus importantes apparaissent en absence de PrP alors que au contraire la surexpression de la PrP semble réduire la taille des lésions par rapport à la lignée sauvage, ce qui suggère un effet neuroprotecteur *in vivo* (Shyu *et al.*, 2005). La PrP^c semble exercer en partie cet effet neuroptotecteur *via* son interaction avec la protéine STI-1 (pour stress-inducible protéin 1), le complexe PrP^C-STI-1 permettant d'induire une protection des neurones et des astrocytes contre la mort cellulaire et le renouvellement des progéniteurs neuronaux (Zanata *et al.*, 2002 ; Santos *et al.*, 2011). Par ailleurs durant l'ischémie une augmentation de la coupure physiologique de la PrP^C au site alpha, libérant le fragment N-terminal N1 a aussi été observée et ce fragment N1 pourrait avoir une activité neuroprotectrice (Guillot-Sestier *et al.*, 2012).

2.4.3. Rôle de la PrP dans les fonctions synaptiques et la transduction de signal

Comme mentionné précédemment la PrP est fortement exprimée dans les neurones, elle est très présente le long des axones et dans les compartiments post- et présynaptiques des terminaisons nerveuses d'après les études immunohistochimiques réalisées par microscopie électronique et photonique sur des cerveaux de primates et de rongeurs. De plus la PrP est sujette à un transport axonal rétrograde et antérograde dans des vésicules sécrétoires. Ces données pourraient

suggérer une éventuelle fonction de cette protéine dans la régulation de la transmission et la plasticité synaptique (Wulf *et al*., 2017).

Un autre rôle attribué à la PrP^C est la transduction de signal de l'environnement extérieur vers l'intérieur de la cellule, cette fonction est suggérée par sa localisation sur les radeaux lipidiques qui sont maintenant généralement reconnus comme ayant un rôle de plateformes de signalisation au niveau de la membrane. Un exemple de cette fonction a été observé avec l'un des premiers partenaires de la PrP^C identifié, la kinase Fyn. Ainsi le crosslinking *in vitro* de la PrP^C avec un anticorps anti-PrP a la surface cellulaire permet l'activation de la Fyn en présence de cavéoline (Mouillet-Richard *et al*. 2000). Plusieurs effecteurs en aval sont alors aussi activés : les kinases ERK 1 et 2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), la NADPH oxydase et le facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element Binding) (Schneider *et al*. 2003 ; Toni *et al*. 2006 ; Mouillet-Richard *et al*. 2007 ; Pantera *et al*. 2009 ; Pradines *et al*. 2008).
Étant donné que la Fyn kinase est associée à la prolifération et la survie cellulaire, la PrP pourrait jouer un rôle dans la modulation de la survie des cellules neuronales.

2.4.4. Effet anti-apoptotique de la PrP

Une étude réalisée sur des levures soumises à une apoptose provoquée par la surexpression de la protéine Bax a permis de mettre en évidence une activité anti-apoptotique de la PrP, la co-expression de PrP et de Bax dans ces levures a permis de réduire le taux d'apoptose de 80% (Li et Harris., 2005). Une autre étude est arrivée à une conclusion similaire sur des lignées cellulaires dérivées d'hippocampe de souris *Prnp* $^{-/-}$ ou *Prnp* $^{+/+}$ et soumises à une apoptose provoquée par leur exposition a un milieu sans sérum (Kuwahara *et al*., 1999). Cependant la voie de signalisation exacte et les mécanismes cellulaire impliquées dans cette protection contre l'apoptose reste à déterminer une piste éventuelle impliquerait une interaction entre la PrP et la protéine Bcl-2.

2.4.5. Rôle lié à l'interaction entre la PrP et les oligomères d'Aß

De nombreuses études décrivent la présence d'une interaction entre le PrP et les oligomères d'Aß, le fragment protéique neurotoxique impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Cependant la fonction exacte qui découlerait de cette interaction reste incertaine. D'une part certains résultats indiquent la présence d'une interaction entre la PrP, Aß, et le récepteur du glutamate mGluR1

formant le complexe Aß-PrP-mGluR5 qui entraine une dépression à long terme *in vivo* et une diminution des épines dendritiques en culture de neurone qui semble dépendre d'une activation PrP dépendante de la protéine Fyn. Ces données suggèrent que la cytotoxicité des oligomères d'Aß pourraient être en partie médiée par la PrP.
D'autre part il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que le fragment N1 de la PrP pouvait se lier aux oligomères de bêta-amyloïde réduisant leur neurotoxicité et perturbant la fibrillation du peptide Aß. De plus le taux de coupure alpha de la PrP^C, c'est à dire le clivage de la partie N1 par les métalloprotéases, augmente dans le cerveau des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait être un mécanisme de protection endogène contre la toxicité des oligomères d'Aß chez l'Homme (Wulf *et al*. 2017).

2.4.6. Rôle antioxydant de la PrP cellulaire

Les ions Cu^{2+} agissent comme des cofacteurs dans de nombreuses réactions enzymatiques, ils peuvent aussi se montrer cytotoxiques de par leur capacité à générer des espèces réactives d'oxygénés (ERO) (Berlett et Stadtman. 1997). La PrP en liant le cuivre au niveau de l'histidine de sa région octapeptide (PHGGGWGQ) (Jackson *et al*. 2001) pourrait avoir un rôle dans le métabolisme du cuivre et un effet antioxydant. Cependant en dépit du fait qu'un effet antioxydant a été suggéré par des expériences réalisées sur des souris et des cellules *Prnp* -/- (Wong *et al*. 2001 ; Brown *et al*. 1997), une description plus spécifique et plus précise du phénomène au niveau moléculaire fait défaut à ces études. De plus le rôle de la PrP^C dans le métabolisme du cuivre est encore controversé.

En conclusion au regard des nombreuses informations récoltées sur le sujet il semble y avoir suffisamment de preuves que la PrP^C est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques du système nerveux central et périphérique. Cependant il semble improbable que la protéine soit impliquée de façon très significative dans un aussi grand nombre de fonctions cellulaires, en particulier lorsque l'on considère le faible nombre de pathologies observées chez les souris $PrP^{0/0}$. La détermination de la ou des fonctions exactes de la PrP^C reste donc un sujet d'étude à explorer plus en détail

3. La protéine prion pathogène :

3.1. Présentation de la PrP^{Sc}

Bien que la transmissibilité de l'agent pathogène responsable des ESST ait été établie dés 1936 (Hauw *et al*., 2015) son identification a demandé plusieurs années de recherches.

Une première théorie proposée par bjorn Sigurdsson en 1954 suggère que l'agent responsable des ESST soit un virus lent ou « slow virus » en raison de la longue phase d'incubation caractéristique des maladies à prion (Sigurdsson., 1954), 5 ans plus tard William Hadlow observe que la tremblante du mouton et une autre ESST qui touche l'homme « le kuru » présentent de nombreuses similitudes (Hadlow., 1959).

Cependant la thèse du virus devenait moins populaire au fur et à mesure que les informations sur l'agent infectieux s'accumulaient. Le poids moléculaire et les propriétés biochimiques de l'agent responsable des ESST ne correspondait pas à ceux d'un virus. De plus l'infectiosité de l'agent responsable des ESST pouvait être réduite par des procédés permettant l'hydrolyse ou la modification des protéines mais restait résistante aux procédés visant à altérer les acides nucléiques, ainsi J.S. Griffith proposa pour la première fois en 1967 des mécanismes d'autoréplication d'une protéine seule sans l'intervention de molécule d'ADN (Griffith 1967).

Finalement c'est en 1982 que S.B Prusiner fera la démonstration que la protéine PrP^{Sc} issue d'un repliement anormal de la protéine prion PrP^{C} est le seul agent responsable des maladies à prion. Il proposa alors le terme prion « Proteinaceous and infectious » pour désigner ce nouvel agent infectieux. Ses travaux lui vaudront le prix Nobel de médecine en 1997 (Prusiner 1982). Plus tard une étude a démontré que des souris invalidées pour le gène de la PrP (souris dites « Knock-out » ou $PrP^{0/0}$) sont résistantes à l'infection par les prions alors que les souris normales infectées par un prion développent les symptômes neurologiques d'une ESST et meurent, confirmant que la maladie se propage bien par conversion de la PrP^{C} de l'hôte en PrP^{Sc} (H. Büeler *et al*., 1993). Plus récemment certains assemblages constitués uniquement de protéine prion recombinante se sont avérés capables d'induire une maladie à prions chez des souris transgénique (Kim *et al*., 2018).

La PrP^{Sc} est donc la forme modifiée de la PrP^{C} qui est associée à la pathologie, c'est-à-dire capable de s'auto-propager et de se transmettre. La structure primaire des deux formes PrP^{C} et PrP^{Sc} est identique et elles présentent les mêmes modifications post-traductionnelles à l'exception d'une différence dans les ratios des glycoformes. Cependant bien que les structures tertiaire et quaternaire à haute résolution de la PrP^{Sc} ne soient pas encore complètement établies on sait que sa conformation est très différente de la PrP cellulaire normale. En effet la PrP^{Sc} est fortement enrichie en feuillet bêta (43% de feuillets ß dans la Prp^{Sc} contre 3% dans la PrP^{C}) et a totalement ou au moins en très grande partie perdue ses structures en hélice alpha (Pan *et al*., 1993), de plus la PrP^{Sc} contrairement à la PrP^{C} est agrégative et adopte un arrangement oligomérique ou multimérique. La partie N-terminal intrinsèquement désordonnée de la PrP^{C} bien que conservée dans la PrP^{Sc} reste sensible à la PK et ne semble pas nécessaire à la conversion**.** (Caughey *et al*., 1991)

De nombreuse maladies à prions sont associées à la présence de dépôts de type amyloïde de PrP^{Sc} dans les cerveaux des animaux ou des humains malades (Prusiner., 1998). Un assemblage amyloïde présente une structure quaternaire fibrillaire visible en microscopie électronique, une figure de diffraction des rayons X caractéristique d'une structure en feuillets croisés, et une affinité pour le rouge Congo associée à une biréfringence (Westermark *et al*., 2005). Les protéines amyloïdes sont capables de s'associer en protofilaments, puis plusieurs protofilaments peuvent s'associer sous forme de fibres, puis de plaques amyloïdes (Fändrich, 2007).

Le changement de conformation de la PrP^{C}, c'est-à-dire sa conversion en PrP^{Sc}, entraine une modification des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques de la protéine, ainsi la PrP^{Sc} est insoluble dans les détergents non ioniques et présente généralement une résistance partielle à la digestion par les protéases. Les fragments obtenus après digestion enzymatique sont appelés PrP^{res}, la PrP^{res} est donc une définition opérationnelle qui désigne la PrP qui a résisté à une digestion par les protéases, en l'occurrence dans la très grande majorité des cas par la PK qui a servi de référence à ce type de digestion. Cette PrP^{res} est le seul marqueur biochimique des prions et correspond dans la grande majorité des cas au deux tiers de la partie COOH terminale de la protéine. Les 60 à 80 premiers acides aminés de la partie N-terminale restant sensible à la digestion selon la souche de prion considérée (Caughey et Raymond. 1991 ; Fiorini *et al*., 2017). La partie N-terminale intrinsèquement désordonnée de la PrP^{C} bien que conservée dans la PrP^{Sc} n'est pas nécessaire à la conversion. (Caughey *et al*., 1991)

Propriétés	PrP^{c}	PrP^{Sc}
Feuillet Bêta (%)	3%	43%
Hélice alpha (%)	42%	0-30 %
Résistance aux protéases	-	+
Soluble dans des détergents non dénaturant	+	-
État de la protéine	monomérique	agrégée
Infectiosité	-	+

Tableau 1 : Propriétés physico-chimique de la PrP^{C} et de la PrP^{Sc}

3.2. Propriétés physicochimiques et données structurales

3.2.1. Données structurales à basse résolution

Bien que des informations structurales a basse résolution de la PrP^{Sc} soient disponibles, on ne connait pas encore sa structure de manière définitive bien qu'elle soit en passe d'être résolue. Plusieurs modèles ont été suggérés. L'étude structurale de la PrP^{Sc} est particulièrement difficile en raison de différents facteurs, d'abord les assemblages de PrP^{Sc} semblent être très hétérogènes sur le plan structural, de plus la protéine est difficile à isoler, insoluble dans l'eau et les détergents non ioniques, agrégative, polymérique et elle présente des degrés variables de modifications post-traductionnelles, notamment une glycosylation (Baskakov *et al.* 2018). Cependant en dépit de ces contraintes de nombreuses techniques ont été utilisées pour renseigner sur la structure de la PrP^{Sc} :

- La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et le dichroïsme circulaire (CD) ont permis de déterminer que la PrP^{Sc} est riche en feuillets bêta (Caughey *et al.*, 1991 ; Safar *et al.*, 1993).
- L'utilisation de certains produits chimiques comme le tétranitrométhane (TNM) sur la PrP^{res} d'une souche 263K de hamster syrien, a permis d'observer une réduction de la réactivité des tyrosines 225 et 226 dans la PrP^{Sc} en comparaison a la PrP^{C}, attestant d'un

réarrangement structural de la région C-terminal durant la conversion (Gong *et al*., 2011)

- La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a permis l'analyse de fibres amyloïdes de PrP^{Sc} purifiées à partir de cerveaux de hamsters syriens infectés par le prion 263K. Cette étude a démontré que la courbe de SAXS obtenue correspond à celle d'un cylindre de 11.0 +/- 0.2 nm. Cette mesure constitue une estimation du diamètre des fibres amyloïdes de PrP^{Sc} en suspension indépendamment des erreurs potentiellement introduites par une adsorption sur une surface ou par la coloration négative nécessaire aux observations en microscopie électronique (Amenitsch *et al*., 2013 ; Sim et Caughey., 2009).
- La diffraction des rayons X a aussi permis d'étudier les fibres de PrP^{Sc}. Il est d'abord important de noter que l'utilisation de la cristallographie aux rayons X qui a permis l'obtention de la structure a haute résolution de nombreuses protéines, est dans ce cas inadéquate. En effet cette technique nécessite la formation de cristaux présentant un fort pouvoir diffractant ce qui est presque impossible à réaliser avec des protéines d'une certaine taille, sujettes à l'agrégation, telles que la PrP^{Sc}, contrairement à ce que l'on peut faire avec de petits peptides amyloïdogènes. Cependant des analyses de diffraction aux rayons X de fibres amyloïdes ont été effectuées pour plusieurs souches de prion avec de la PrP^{Sc} purifiée à partir de cerveaux de hamsters syriens ou de souris infectées. Les profils de diffraction obtenus suggèrent que les prions adoptent une architecture en bêta solénoïde avec une unité de 1,92 nm qui se répète le long de l'axe fibrillaire (Will *et al*., 2009 ; Wan *et al*., 2015)
- La microscopie électronique a coloration négative a permis la première visualisation de prion en tant que « prion rods », segments amyloïdes larges obtenus au cours d'une procédure de purification de la PrP^{res} en présence de sarkosyl, dont l'infectivité a été montrée par inoculation à l'animal (Prusiner *et al*., 1983). En fonction de la souche, de l'hôte, de la présence ou de l'absence de l'ancre GPI, ainsi que d'autre paramètres expérimentaux, le diamètre moyen des protofilaments de fibres amyloïdes de PrP^{Sc} varie entre 3 et 6 nm. En raison de la présence d'agents de contraste de métaux lourds, des conditions d'éclairage à haute intensité et des expositions souvent longues, aucun détail structural à haute résolution n'a pu être obtenu par le biais de cette technique. (Amenitsch *et al*., 2013 ; Will *et al*., 2009)

- L'Observation par microscopie a force atomique de fibres amyloïdes de PrP^{Sc} de prion 22L et RML a suggéré quant à elle que le diamètre des protofilaments est de 5.5 nm (Sim et Caughey., 2009) correspondant à la hauteur de la fibre adsorbée sur la surface.
- Pour surmonter les limites de la microscopie électronique, des données structurelles à plus haute résolution ont été obtenues grâce à l'utilisation de Cryo-microscopie électronique. Les image en 2D permettent de visualiser la nature hélicoïdale de fibrilles individuelles, mais peu de détails structuraux ont été obtenus au-delà de leur topologie globale. Cependant, des données à plus haute résolution peuvent être obtenues à partir de reconstructions 3D qui tirent parti de la symétrie hélicoïdale au sein de ces fibrilles. Pour une forme de PrP^{Sc} sans ancrage GPI, des micrographies électroniques ont été collectées afin de générer des reconstructions 3D de fibrilles amyloïdes de PrP^{Sc} qui révèlent que chaque fibrille est composée de deux protofilaments et que la hauteur de chaque molécule individuelle de PrP^{Sc} au sein du protofilament est de 1.8 nm ce qui est proche de l'estimation faite par diffraction au rayon X suggérant une unité de 1,92 nm qui se répète le long de l'axe fibrillaire (Requena et Wille. 2017).

3.2.2. Modèles proposés pour la structure de la PrP^{Sc}

Jusqu'à très récemment la structure tertiaire et quaternaire de la PrP^{Sc} n'était pas disponible. Plusieurs modèles basés sur les données à basse résolution ont été proposés. Les plus important étant le modèle en « ß-solénoïde » et le modèle « parallel in-register » dans lequel chaque molécule est agencée de façon plane et les différents plans sont juxtaposés parallèlement de manière identique pour chaque molécule. Jusqu'à très récemment il était impossible de clairement départager ces deux modèles. Il a même été suggéré que les deux organisations pourraient coexister car une certaine diversité structurale existe au sein des prions (Baskakov *et al*., 2018). En effet pour une même souche de prion il est possible d'observer une grande variété de taille, de structures et de caractéristiques biochimiques. Ces éléments peuvent être fortement affectés par le type d'hôte ou la présence ou non d'une ancre GPI (Chesebro *et al*. 2005). Ainsi la taille des prions peut aller du petit oligomère non fibrillaire a la fibre amyloïde de plusieurs nanomètres de long, ce qui amène la question de savoir si cette différence de taille correspond à un continuum plus ou moins étendu d'une même structure ou à des arrangements de monomères fondamentalement différents (Silveira *et al*. 2005). Cette variabilité pourrait suggérer que la PrP^{Sc} puisse avoir plus d'une structure.

3.2.2.1. Modèle Parallel in register

Le modèle de structure tertiaire « parallel in-register» est un modèle dans lequel le monomère est entièrement plan et principalement composé de feuillets β (Figure 6) (Cobb *et al*. 2007). Dans ce modèle les monomères s'empileraient parallèlement, chaque résidu de la protéine étant aligné avec le même résidu de l'autre molécule, ce qui permet une stabilisation de la structure par des interactions hydrophobes. Les feuillets β des protéines formant la fibre sont tous parallèles et dans la même direction. Des études par RMN du solide réalisée sur des fibres amyloïdes de PrP recombinante sont en faveur de ce modèle. (Cobb *et al*. 2007 ; Tycko *et al*. 2010). Cependant bien que ces fibres puissent émerger spontanément et s'autopropager *in vitro*, il reste à déterminer si ces structures sont représentatives des divers agrégats de PrP^{Sc} a l'origine des maladies à prions naturelles. De plus le modèle semble poser un problème stérique concernant la présence des chaines N-glycanes complexes sur les deux sites de glycosylation, chacun des sites étant situé exactement au même niveau sur les différentes molécules qui sont juxtaposées, d'autant plus qu'il existe des souches avec une forte glycosylation et pour lesquelles la plupart des monomères de PrP sont glycosylés et même très majoritairement biglycosylés.

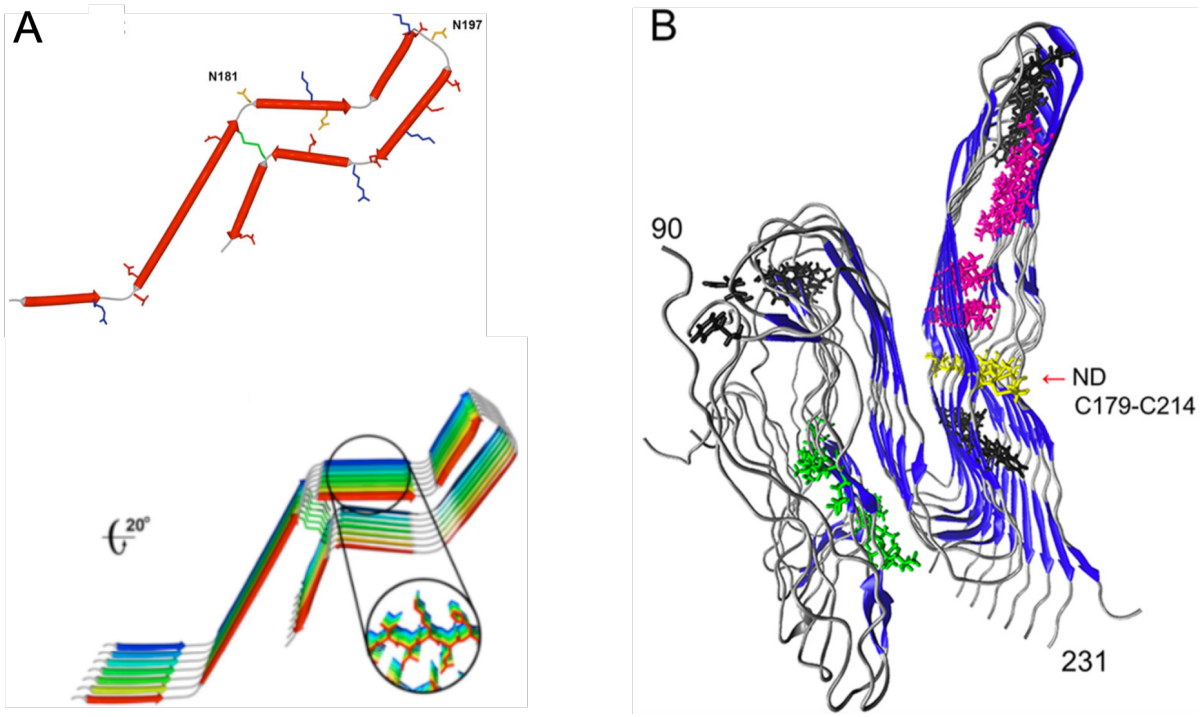

Figure 6 : Le modèle de structure de la PrP^{Sc} « parallel in-register »

A) Modèle «parallel in-register» élaboré en 2007, basé sur l'étude structurale couplant la résonance paramagnétique électronique (RPE) et le marquage de spin. Dans ce modèle les feuillets β des protéines formant la fibre sont tous parallèles et dans la même direction (Cobb *et al*., 2007).
B) Amélioration du modèle de 2007 sur la base de données plus récente obtenues en partie par RMN du solide (Groveman *et al*.,2014).

3.2.2.2. Modèle bêta Solenoïde

En analysant un empilement cristallin en 2D de PrP^{Sc} par microscopie électronique (Wille *et al*. 2002), Stanley Prusiner a proposé le modèle d'hélice bêta gauche («Left handed beta helix ») (Figure 7) dans lequel les feuillets β de la PrP^{sc} s'organiseraient en un cœur hélicoïdal. Des interactions entre les feuillets β de différents monomères de PrP^{Sc} permettraient à ses monomères de s'assembler en trimères, les arbres de glycosylation restant en périphérie. L'empilement de ces trimères formerait des fibrilles enroulées en hélice gauche, puis ces fibrilles s'assembleraient pour former des fibres amyloïdes (Govaerts *et al*. 2004). Ce modèle est aujourd'hui considéré comme inexact car il inclut la présence d'hélices alphas qui d'après les données de FTIR et de CD semblent absentes de la PrP^{Sc} (Baron *et al*., 2011). Un modèle plus récent de PrP^{Sc} de souris basé sur une architecture en ß-solénoïde correspondant à une évolution du modèle précédent et qui satisfaisait aux données expérimentales plus récentes a été proposé par Requena et ses collaborateurs (Silva *et al*., 2015). Ce modèle est en accord avec les premières données de cryo-microscopie électronique qui n'avaient cependant qu'une faible résolution (Vázquez-Fernández *et al*., 2016), mais aussi avec celles de diffraction des rayon X de fibres, de dichroïsme circulaire et FITR ainsi que de l'analyse par spectrométrie de masse de PrP^{res} obtenu après digestion par PK dans des conditions particulières de détergents qui permettent la coupure d'une petite proportion de molécules à des sites interprétés comme de boucles plus accessibles qui sépareraient les feuillet bêta (Spagnolli *et al*. 2019).

3.2.2.3. Autres modèles

Ces deux modèles « parallel in-register» et en tonnelet « beta Solenoid » paraissent les plus probables mêmes si d'autres modèles moins bien étayés avaient également été proposés au cours du temps, tel qu'un modèle à deux modules avec une partie N-terminale et une partie C-terminale formant chacune un empilement séparé par une région moins structurée (Kunes *et al*.,

2008), un modèle basé essentiellement sur la transconformation de la partie H2-H3 (Chakroun *et al*., 2010) ou un modèle basé sur un « domain swapping » de la PrP (Hafner-Bratkovič *et al*., 2011).

3.2.3. Avancées récentes: structure de la PrP^{Sc} et des fibres

Des avancées récentes utilisant la Cryo EM confirment et mettent en évidence une architecture basée sur une organisation « parallel-in-register intermolecular β-sheet » (PIRIBS) des fibres amyloïdes de PrP^{Sc} de hamster purifiées à partir de cerveaux de hamster infectés par la souche 263K de prion (Kraus *et al*., 2021. Préprint doi : https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431014). Même si les résultats présentés devront être confirmés par d'autres travaux, il semble qu'il s'agisse de l'établissement de la première structure à haute résolution d'un prion de mammifère. Il est a noté que l'analyse en Cryo-EM de fibres amyloïdes de PrP recombinante produites *in vitro* montrent aussi une organisation générale basée sur un même type d'empilement en feuillet bêta « in register » des molécules de PrP au moins pour la partie C-terminale des fibres, même s'il semble exister d'importantes différences entre la structure des fibres et celle rapportée pour le prion 263K (Wang *et al*., 2020 ; Glynn *et al*., 2020) (Voir paragraphe IV.2)

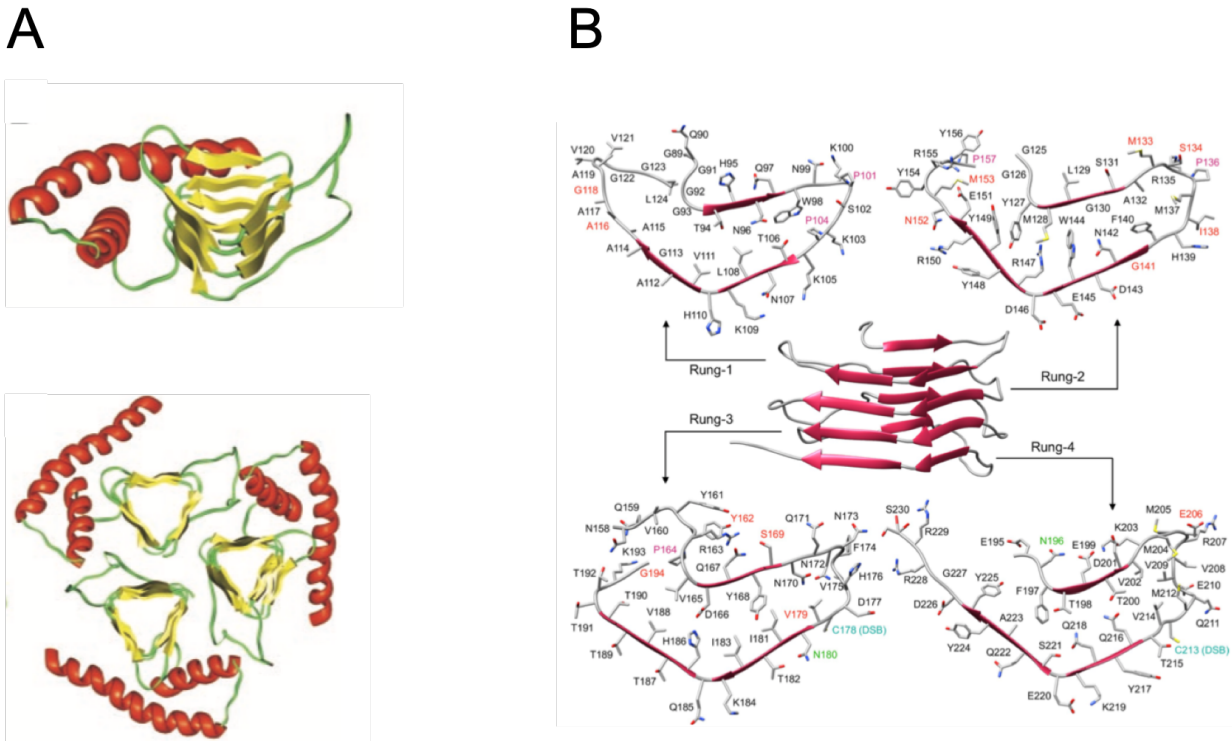

Figure 7 : Le modèle de structure de la PrP^{Sc} en tonnelet « beta Solenoid »

A) Modèle en tonnelet élaboré en 2004 sur la base d'une étude par microscopie électronique d'un empilement cristallin en 2D de PrP$^{Sc.}$ Dans ce modèle les feuillets β de la PrP^{sc} s'organiseraient en un cœur hélicoïdal (Govaerts *et al*., 2004).

B) Modèle en tonnelet proposé en 2019 basé sur des données de cryo-microscopie électronique a basse résolution, de diffraction des rayon X de fibres, de dichroïsme circulaire et d'FITR (Spagnolli *et al*. 2019).

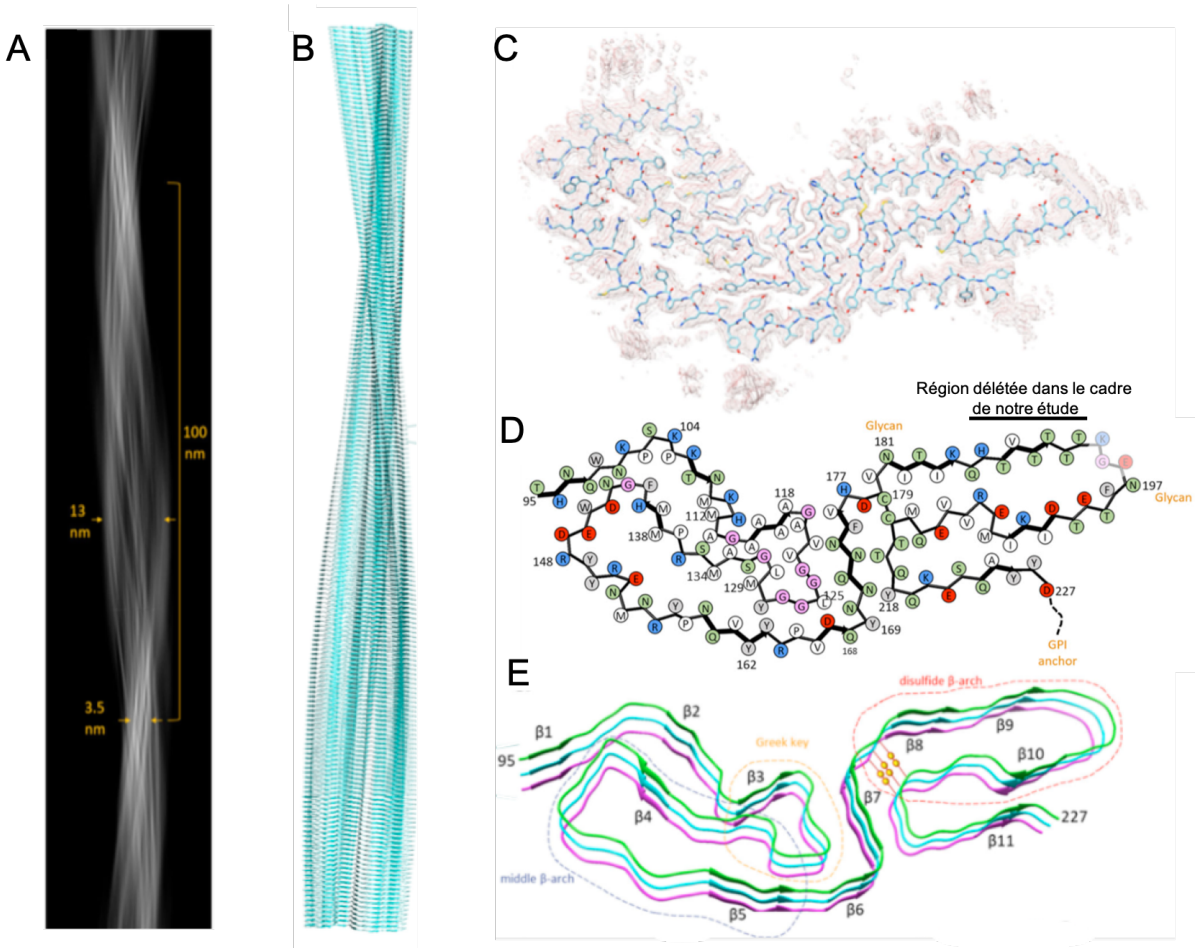

Figure 8 : Structure de la souche 263K de prion de hamster par cryo-EM (Kraus *et al*., 2021).

A) Projection de la carte de densité électronique des fibres.

B) Modèle représentant une fibre étendue.

C) Vue d'une coupe horizontale dans la carte de densité électronique comprenant les résidu 95 à 227

D) Représentation schématique du cœur de la fibre montrant l'orientation des chaine latérales des résidus par rapport au squelette peptidique

E) Représentation d'un empilement trimérique des feuillets bêta dans un segment de la fibre.

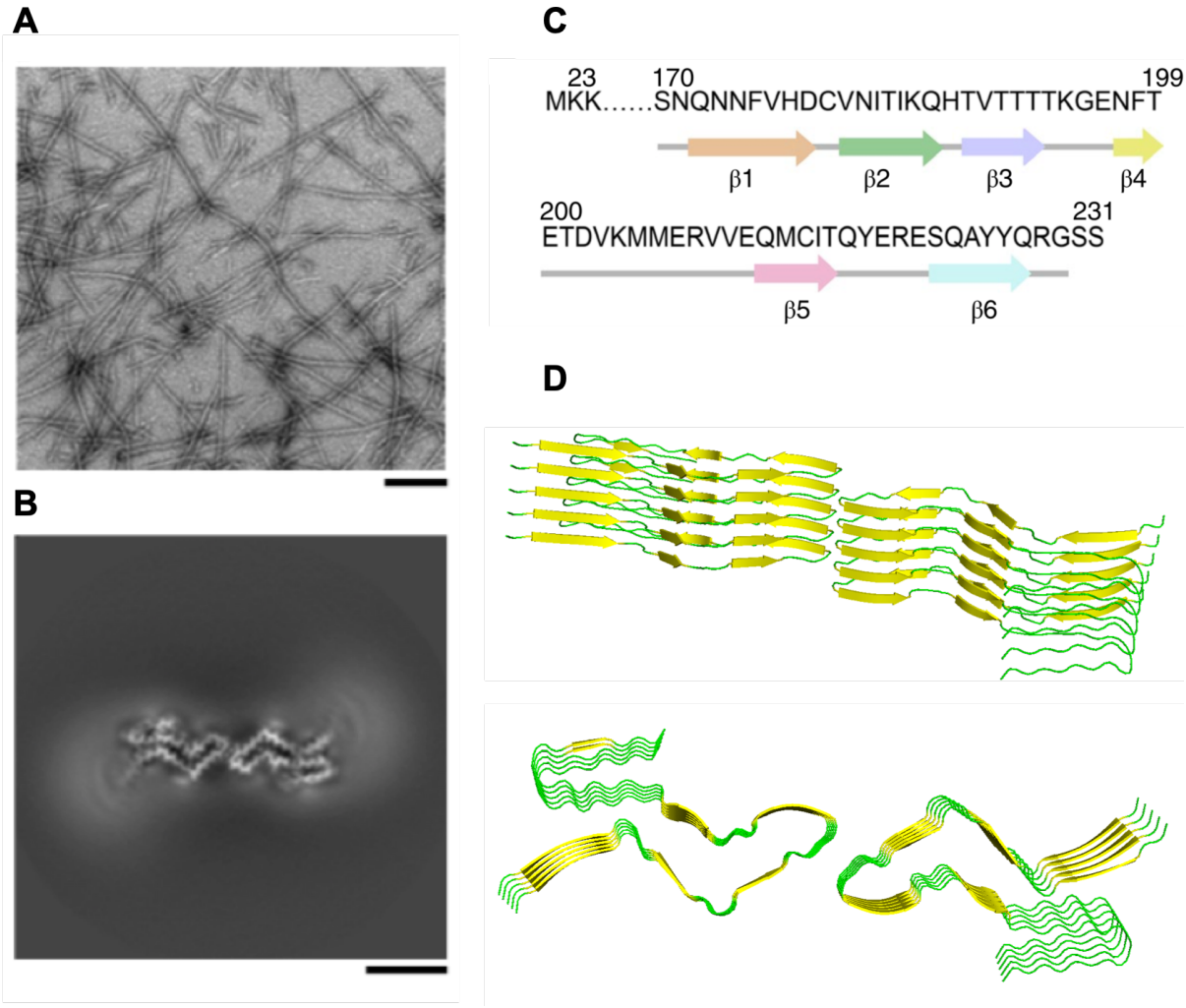

Figure 9 : Structure des fibres amyloïdes de PrP recombinante, obtenue par cryo-EM (Wang *et al*., 2020).

A) Image des fibres de PrP recombinante humaine de pleine longueur obtenue par microscopie électronique à coloration négative
B) Vue d'une coupe horizontale dans la carte de densité électronique des fibres montrant deux protofilaments formant un dimère
C) Séquence de la PrP comprise entre les résidus 170 a 231 montrant la localisation des 6 brin bêta observés.
D) Structure tridimensionnelle de la région 170-231 des fibres recombinantes de PrP humaine. Entrée 6LNI de la PDB

3.3. Mécanismes de conversion et de réplication

Le caractère infectieux des prions semble découler directement de leur capacité à s'auto-propager tout en maintenant leur information infectieuse, le maintien et l'amplification de l'information infectieuse étant le processus central de chaque pathogène. Dans ce contexte la PrP^{Sc} servirait d'empreinte dans la transmission du repliement anormal a la PrP^{C}.
Le suivi de l'apparition de la PrP^{Sc} au cours du temps *in vivo* et de l'amplification des prions *in vitro* permet l'observation d'une phase de latence suivie d'une croissance exponentielle, ce qui indique un premier processus cinétiquement lent suivie d'un processus coopératif plus rapide. (Griffith., 1967) Bien que les mécanismes qui régissent la conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} ainsi que l'émergence spontané de la PrP^{Sc} restent à ce jour incompris deux modèles tentent d'expliquer le phénomène.

3.3.1. Le modèle autocatalytique

Le modèle autocatalytique ou « template-directed refolding » a été introduit par Griffith et propose que la PrP^{Sc} catalyse sa propre formation à partir de PrP^{C}. Dans ce premier model on suppose qu'un monomère de PrP^{Sc} serait en mesure de s'associer avec un monomère de PrP^{C} formant un hétérodimère (PrP^{C}-PrP^{Sc}) capable de convertir la PrP^{C} en PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} néoformée étant ensuite capable de catalyser la conversion d'une ou d'autres PrP^{C}. Afin que ce modèle soit possible deux conditions doivent être remplies, il faudrait que la PrP^{Sc} puisse exister sous l'état de monomère et qu'elle soit dans cette conformation thermodynamiquement plus stable que la PrP^{C}. La présence d'un intermédiaire noté PrP* qui correspond à une PrP^{C} partiellement dépliée a été ensuite proposée afin d'améliorer le modèle. Cet intermédiaire permettrait d'abaisser la barrière énergétique nécessaire à la formation d'une nouvelle PrP^{Sc}. Contrairement à la PrP^{Sc} l'intermédiaire PrP* serait sensible à la dégradation et pourrait revenir vers la forme PrP^{C}. PrP* résulterait de variations aléatoires de la conformation de la PrP^{C} ou bien de l'association de la PrP^{C} avec des facteurs cellulaires ou une protéine chaperonne. Selon ce modèle dans les conditions normales la concentration de PrP* est basse et la barrière énergétique permettant le changement de conformation étant élevé la formation de PrP^{Sc} n'a pas lieu ou est insignifiante. L'infection par un prion permet d'introduire une matrice qui va promouvoir la conversion de PrP* en PrP^{Sc}, cette dernière étant très stable va s'accumuler. Par ailleurs les cas sporadiques pourraient être dus à une accumulation de la PrP* qui entrainerait

un franchissement aléatoire de la barrière d'énergie et la formation de PrP^{Sc}. Les mutations causant les formes familiales de la maladie auraient pour effet de déstabiliser la forme PrP^{C} permettant ainsi l'accumulation de la PrP* (Huang, Prusiner, et Cohen, 1996).

3.3.2. Le modèle de nucléation-polymérisation

Ce modèle imaginé par Lansbury et Caughey propose que les deux isoformes existent en équilibre et que cet équilibre tend vers la PrP^{C} dans des conditions normales. Il implique une étape dite de nucléation qui correspond à la formation d'un noyau, un oligomère de PrP^{Sc} disposant d'une activité de conversion. Cette étape réversible serait à l'origine de la phase de latence qui est observée lors de la formation spontanée de PrP^{Sc} et représenterait donc l'étape limitante du mécanisme car elle est non favorable thermodynamiquement, l'ensemble des interaction résultantes ne couvrant pas le coût entropique nécessaire à la formation du noyau. Une fois le noyau formé l'addition de monomère de PrP^{C} devient thermodynamiquement favorable provoquant une phase d'élongation rapide et peu réversible qui aboutit à l'accumulation de PrP^{Sc}. Ce modèle est en accord avec des processus de polymérisation bien définis comme la cristallisation d'une protéine ou la formation de microtubules. De plus les 3 caractéristiques qui le définissent (phase de latence, concentration critique et propriété d'ensemencement) sont retrouvées expérimentalement lors de la conversion spontanée *in vivo* et *in vitro* de la PrP.

Ce modèle explique donc la rareté des cas sporadiques par la lenteur de cette phase de nucléation. Elle propose aussi que certaines mutations puissent faciliter l'émergence de la maladie en altérant l'équilibre PrP^{C} / PrP^{Sc}. L'efficacité et la plus ou moins grande rapidité des infections viendrait du fait que l'introduction de PrP^{Sc} exogène permettrait d'outrepasser l'étape limitante du mécanisme (Jarret et Lansbury. 1992 ; Lansbury et Caughey 1995).

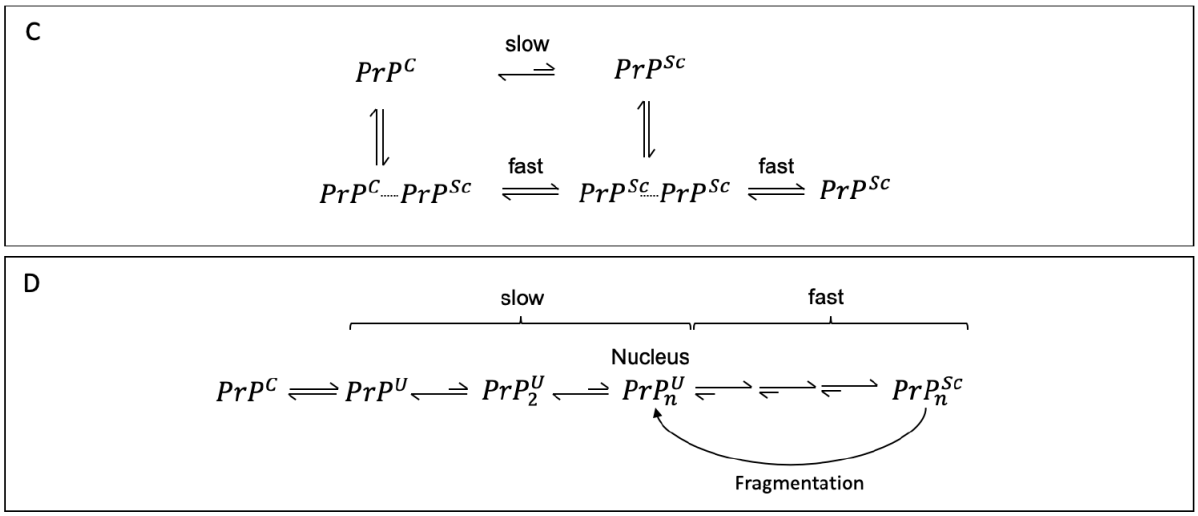

Figure 10 : Mécanismes de conversion et de réplication des prions

A) Le modèle autocatalytique (Huang, Prusiner, et Cohen, 1996).
B) Le modèle de nucléation-polymérisation (Lansburt et Caughey 1995).

3.4. Notions de souche et de barrière d'espèce

3.4.1. Le concept de souche

L'un des phénomènes les plus étonnant dans l'étude des prions est la présence de souches. En effet différents prions peuvent être associés à des ESST présentant des caractéristiques biochimiques et neuropathologiques différentes. Par analogie avec les agents infectieux conventionnels le terme souche de prion a été utilisé (Collinge et Clarke, 2007). La présence de ces souches a été remarquée dés 1961 grâce à une expérience consistant à effectuer une inoculation intracérébrale de deux formes de tremblante a des chèvres et aboutissant au développement de deux symptomatologies différentes (Pattison et Millson., 1961). De nombreux travaux scientifiques ont apporté depuis lors des preuves solides sur l'existences des souches de prions et ont permis leur identification et leur caractérisation. Il a été possible de cloner biologiquement des souches à partir des échantillons bruts. Historiquement les premières souches ont été obtenues par l'inoculation d'échantillon de tremblante du mouton (scrapie) dans des lignées de souris congéniques ou chez le hamster, ensuite ont été utilisées des souris $PrP^{0/0}$ pour le gène de souris mais exprimant un transgène correspondant à une PrP exogène : humaine, ovine, bovine, cervidé ou campagnol (Dickinson *et al.*, 1968, Watts et Prusiner., 2014). Concrètement l'échantillon de base est dilué de 10 en 10 avant l'inoculation. Les homogénats de cerveaux des souris qui tombent malades aux plus faibles dilutions sont inoculés selon la

même procédure pour au moins deux passages supplémentaires chez le même hôte (Langevin *et al*., 2011).

En pratique une même souche inoculée par la même voie avec une même dose a des animaux possédant un fond génétique similaire reproduira de façon fidèle ses caractéristiques. Les souches de prion sont caractérisées par **1) une période d'incubation** qui représente la durée entre l'infection et la mort de l'animal inoculé. **2) Des signes cliniques spécifiques. 3) Un profil lésionnel** caractéristique. **4) Des caractéristiques biochimiques** tel que le degré de résistance à la PK ou à la dénaturation par la guanidine, le ratio des différents glycoformes ainsi que le profil électrophorétique de la PrP^{res} pour lequel 3 conformations majeurs ont été rapportées en fonction de la taille de la PrP^{res} observée par western blot : 21kDa (type1), 19 kDa (type 2) et 8 kDa. Cette distribution des types de prions n'est cependant généralement pas exclusive, plusieurs cas de CJD sont en fait un mélange de type 1 et type 2 suggérant l'émergence possible de deux souches, simultanément dans un même individu. (Aguzzi *et al.* 2007 ; Bruce *et al.* 2003 ; Langeveld *et al*. 2006 ; Cali *et al*. 2009).

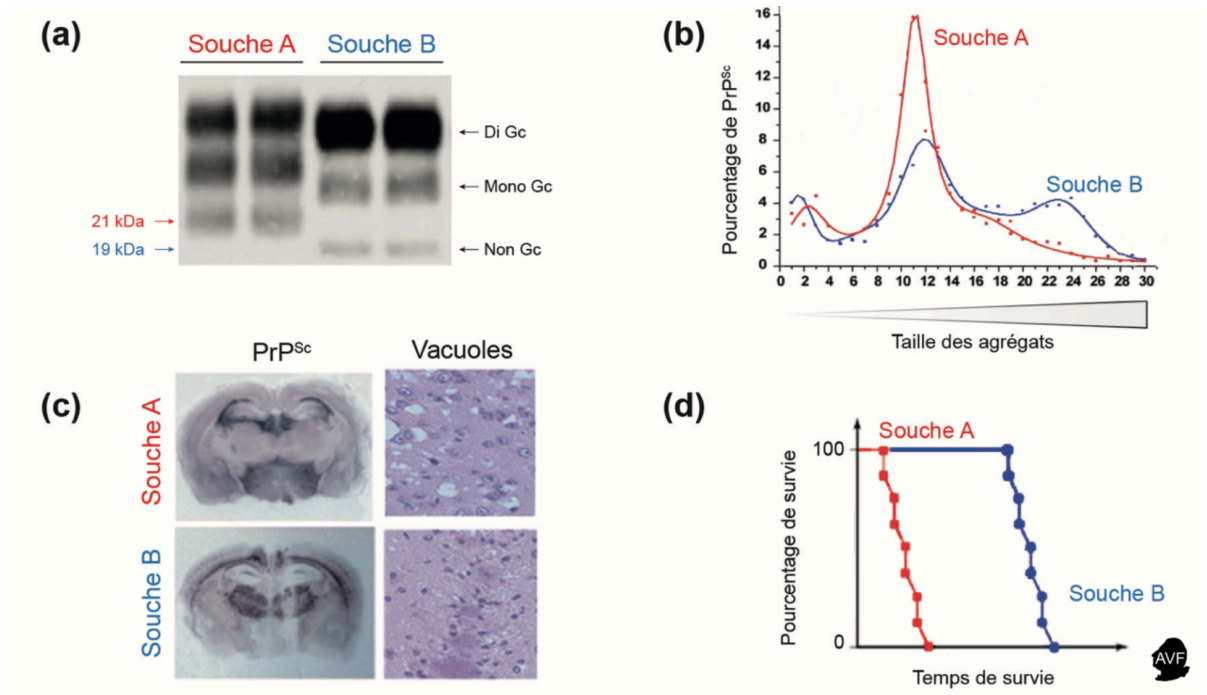

Figure 11 : Caractéristiques permettant de différencier deux souches de prions (Beringue 2017).

a) Différence dans la proportion des trois glycoformes visible sur des profils électrophorétiques.
b) Distribution de tailles des agrégats, visible par vélocité de sédimentation.
c) Distribution des agrégats de PrP^{Sc} et des vacuoles dans le cerveau.
d) Temps d'incubation de la maladie.

L'observation de différentes souches de prions a été le principal argument contre l'hypothèse d'une protéine seule responsable de l'infection. Effectivement, chez les agents infectieux conventionnels les souches sont habituellement dues à des mutations dans un génome, et il pouvait sembler difficile de concilier la grande diversité des souches de prions avec la nature exclusivement protéique de l'agent infectieux. Aujourd'hui l'hypothèse prion a été démontrée et l'explication proposée au phénomène est que les informations de souches sont encodées dans la structure tertiaire et/ou quaternaire de la PrP^{Sc} et que cette dernière est transmise fidèlement lors de la conversion de la PrP^{C} (Telling., 2010 ; Bassen et Marsh 1994). Étant donné que la PrP^{Sc} est glycosylée, une partie ou la totalité de cette information structurale pourrait potentiellement être porté par les glycanes. Afin d'apporter un élément de réponse à cette question notre équipe a amplifié in *vitro* par PMCA la souche 127S ovine en utilisant comme substrat une PrP invalidée pour ses deux sites de glycosylation. L'amplification du prion a été réalisée sur cette PrP aglycosylée. La PrP^{Sc} non glycosylée résultante a été inoculée à des souris exprimant la PrP ovine normale. L'inoculation a produit une ESST présentant les caractéristiques biochimiques et neuropathologiques typiques de la souche originale, ce qui indique que l'information de souches ne semble pas portée par les glycanes (Moudjou *et al*. 2016).

Bien que les prions finissent par s'accumuler dans le système nerveux central (SNC) de leur hôte, l'accumulation périphérique peut également être associée à certaines souches de prions. Les tissus les plus pertinents se sont avérés être les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate. Le lymphotropisme peut être utilisé pour discriminer les souches possédant la capacité à se répliquer dans les organes périphériques de celles qui ne sont détectées que dans le cerveau (Mould *et al*. 1970 ; Béringue *et al*. 2007).

Les inégalités de distribution des agents infectieux dans le SNC suggèrent l'existence d'un tropisme cellulaire de souche. Plusieurs études indiquent que le tropisme d'une souche pourrait dépendre de la structure tertiaire ou quaternaire de la PrP^{sc}, ce qui impacterait son aptitude à s'associer avec un ou des cofacteurs cellulaires spécifiques, qui sont différemment exprimés selon le type cellulaire (Aguzzi, Baumann et Bremer., 2008). Certaines études réalisées *in vivo* et *in vitro* témoignent de l'existence de ce tropisme cellulaire. *In vivo*, lorsque des homogénats de rate ou de cerveau d'un même hôte sont inoculés à des souris avec un même fond génétique, les caractéristiques de souches observées chez les animaux inoculés sont différentes (Béringue

et al. 2012) une étude immunohistologique réalisée *in vivo* a fourni des preuves que les souches de prions adaptées à la souris Me7 et 22L étaient préférentiellement associées aux neurones et à l'astroglie respectivement (Caroll *et al*., 2016). *In vitro* l'infection de cultures primaire de neurones soutient qu'un tropisme spécifique à une souche pour différents types de populations neuronales peut contribuer au ciblage différentiel des zones cérébrales observé lors d'infection *in vivo*. En effet, La PMCA région spécifique (rsPMCA) une technique qui utilise comme substrat divers tissus animaux et humains, préparés à partir d'individus adultes confirme le tropisme neuronal et suggère l'implication de facteurs moléculaires en plus de l'impact des fonctions cellulaires et des interactions cellule à cellule qui peuvent varier dans les diverses zones cérébrales. (Levasseur *et al*., 2019)

3.4.2. La notion de barrière d'espèce

La transmission d'une même souche de prion d'une espèce a une autre se traduit presque toujours par un allongement de la phase d'incubation lors du premier passage mais aussi souvent par une diminution du nombre d'animaux infectés voir d'une impossibilité de transmettre la maladie, ce phénomène a été qualifié de **barrière d'espèce** (Prusiner. 1998). Historiquement l'une des premières barrières d'espèces étudiées concernait la transmission du prion de hamster a la souris. Kimberlin a remarqué qu'une souche de tremblante du hamster nommée 263 K passait difficilement à la souris, (Kimberlin et Walker., 1979 ; Kimberlin et Walker., 1978). Ensuite l'utilisation de souris transgéniques exprimant la PrP de hamster a permis la transmission efficace de prion de hamster a des souris soulignant ainsi l'importance de la séquence en acide aminé de la PrP dans la contribution à la barrière d'espèce (Prusiner *et al*., 1990).
Un autre exemple est la sensibilisation à la tremblante du mouton de lapins transgéniques exprimant la PrP ovine alors que l'animal est connu pour être naturellement résistant à l'infection par le prion (Sarradin *et al*., 2015). L'homologie de séquence entre le prion inoculé et la PrP de l'hôte semble être une condition préalable à la réussite d'une infection, l'opinion commune est que la compatibilité structurelle entre la PrP de l'hôte et la souche de prion infectante régit la transmission inter-espèces des prions.

Les approches par PMCA (technique permettant l'amplification in vitro de PrP^{Sc}) ont confirmé que les prions de souris (souche RML) pouvaient être progressivement adaptés aux espèces de hamsters permettant ainsi un franchissement *in vitro* de la barrière d'espèce. L'adaptation en

PMCA peut être réalisée en 4 à 6 cycles (Castilla *et al*., 2008), de même, les prions de hamster (souche 263 K) peuvent être adaptés à la souris. L'observation de barrière d'espèce et leur franchissement ont aussi été réalisé avec d'autres prion tel que le prion bovin vCJD et le prion de cervidés CWD.

Une vue d'ensemble des expériences réalisées semble suggérer qu'au moins au niveau expérimental il n'y a pas de barrière d'espèce absolue. Les prions adaptés tuent généralement tous les animaux inoculés en quelques semaines ou quelques mois, la durée totale d'incubation peut cependant fortement varier, elle peut être de 60 jours pour les plus rapides ou dépasser 700 jours pour certaines souris. En revanche, lorsque les prions sont introduits chez un hôte auquel ils ne sont pas encore adaptés, le pourcentage de survie des hôtes est généralement plus important et le temps d'incubations considérablement augmentés et plus variables. Cependant après un certain nombre de passages les prions adaptés récupèrent un taux d'attaque de 100% et un temps d'incubation réduit et hautement reproductible. (Igel-Egalon *et al.* 2018)

4. La forme enrichie en feuillet bêta de la PrP recombinante :

4.1. Fibres amyloïdes et oligomères de PrP recombinante

La PrP recombinante synthétisée par le biais de système d'expression bactérien peut elle aussi se convertir spontanément *in vitro* vers une forme enrichie en feuillet bêta, elle formera alors selon les conditions expérimentales soit des structures oligomériques soit des fibres bêta amyloïdes. Ainsi des fibres bêta-amyloïdes sont obtenues à partir de PrP recombinante mise sous agitation, à un pH préférentiellement neutre et en présence d'un ou plusieurs agents chaotropes. Le suivi de la cinétique de formation de ces fibres via la thioflavine T (ThT) permet d'observer une phase de latence, suivie d'une rapide accumulation de fibres, caractéristique de la formation d'amyloïdes. Comme observé pour la PrP^{Sc} les fibres présentent i-une structure enrichie en feuillet bêta, ce qui peut être constaté par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FITR) et par dichroïsme circulaire (CD), ii-une certaine résistance à la PK observable mais relativement faible comparée aux prions et iii-une capacité d'amorçage qui permet leur élongation dans un milieu contenant de la PrP recombinante (Bocharova *et al*. 2005). Fait intéressant il semble que l'agitation exercée durant le processus de fibrillation a un impact direct sur la structure des fibres formées, en effet les travaux de Baskakov montrent qu'en modifiant

le mode d'agitation il est possible d'obtenir deux types de fibres PrP différentes sur le plan morphologique et structural (Makarava et Baskakov. 2008).

Par ailleurs des oligomères de PrP recombinante peuvent être formés à pH acide par une courte incubation a 42°C suivie d'un refroidissement progressif, le procédé semble être multimoléculaire et donc très dépendant de la concentration initiale en protéine recombinante. Des travaux sur la PrP ovine recombinante ont permis la caractérisation de deux sous population d'oligomères de 12 et 36 sous-unités qui présentent toutes deux une teneur élevée en feuillets bêta observée par FITR et par CD et une résistance partielle à la pepsine (Rezaei *et al*. 2005)

4.2. Structure des fibres de PrP recombinante

Dans l'optique de contourner les difficultés rencontrées pour résoudre la structure de la PrP^{Sc} extractive, l'étude de PrP recombinante amyloïde produite *in vitro* a été entreprise. Malgré de nombreux travaux la structure de ces fibres amyloïdes de PrP n'a toujours pas été résolue, vraisemblablement à cause de l'hétérogénéité des polymères formés. Par ailleurs des différences structurales entre la PrP^{Sc} et la PrP recombinante sous forme amyloïde ont été constatées. Notamment les spectres de diffraction des rayons X de fibres amyloïdes de PrP recombinante et de PrP^{Sc} indiquent des organisations différentes même si le cœur PK résistant de la PrP^{Sc} ou le cœur de la fibre amyloïdes synthétique sont toutes deux organisées essentiellement en feuillets bêta.

La PrP recombinante semble pourvoir former un prion synthétique avec cependant une infectivité inférieure à celle de la PrP^{Sc}. L'inoculation de fibres de PrP tronquée (90-230) a des souris Tg9949 surexprimant une PrP^{c} homologue a abouti à l'apparition de symptômes typiques d'une maladie a prion chez les souris infectées ainsi qu'à leur mort après une période allant de 380 à 660 jours (Legname *et al*., 2005). D'autres études décrivent des infections par des fibres recombinantes *In vivo* mais soulignent que ces infections présentent des temps d'incubations plus longs que ceux obtenus avec une PrP^{Sc} et n'entrainent pas l'apparition de symptômes de tous les animaux inoculés (Colby *et al*., 2010 ; Muller *et al*. 2014). De plus l'obtention d'une PrP recombinante infectieuse par PMCA semble difficile, elle n'a pu se faire qu'après un nombre important de cycles et uniquement dans certaines conditions impliquant la présence de cofacteurs (Wang *et al*., 2010 **;** Kim *et al*., 2018). Malgré une avancée récente très prometteuse,

la structure d'un polymère PrP recombinante bêta-sheet amplifié par PMCA et présentant une forte infectivité n'a pas encore été résolue (Erana *et al*., 2019). Bien que l'étude structurale de la PrP recombinante amyloïde semble pertinente il est important de garder à l'esprit que l'organisation structurale de ces molécules pourrait présenter des différences notables ou être vraiment différente de celle des prions extractifs même s'ils peuvent se présenter sous une forme amyloïde. Il n'en reste pas moins que la capacité de conversion de la PrP cellulaire par des fibres produites *in vitro* pourrait permettre de mieux comprendre les éléments clés de la conversion.

Les fibres de PrP recombinantes ont été étudiée par RMN notamment car le fait d'exprimer la protéine en bactérie facilite le marquage aux isotope lourd C^{13} et N^{15} nécessaire à l'utilisation de cette technique. La RMN, comme beaucoup d'autres techniques d'analyse structurale exige des quantités substantielles d'échantillon structurellement homogène. La tendance de la PrP à adopter un nombre important de conformères a donc constitué une sérieuse limitation pour résoudre la structure des fibres de PrP. La nature agrégative de la PrP sous forme fibrillaire exige le recours à la RMN du solide afin d'éviter l'importante relaxation longitudinale due à la faible mobilité moléculaire des fibres (Requena et Wille. 2017). Une étude par RMN du solide a été réalisée par Muller et collaborateurs sur des fibres de PrP recombinantes ovines présentant une infectivité relativement modeste sur des souris. L'assignement résidu spécifique des spectres de RMN n'a pas été possible à cause de l'absence de spectre en 3 dimensions néanmoins les données obtenues suggèrent que les fibres adoptent une structure compatible avec le model « in-register » (Muller *et al.* 2014). Une autre étude par RMN du solide a été réalisée sur des fibres de PrP (23-144) recombinantes humaines infectieuses. Cette PrP correspond au variant Y145Stop dont l'extrémité C-terminal est absente et qui est associé à une ESST héréditaire chez l'homme qui provoque une angiopathie amyloïde cérébrale. Ces fibres qui sont infectieuses par inoculation à la souris ont permis l'obtention de spectres RMN de bonne qualité qui ont permis une attribution résidu spécifique du squelette peptidique de la protéine dans sa forme bêta amyloïde. Les spectres RMN démontrent sans ambiguïté que la région 112-141 comprenant 3 feuillets bêta reliées par des boucles plus au moins longues représente le cœur amyloïde de ces fibres et comme pour les fibres décrites précédemment la PrP adoptent une structure compatible avec le modèle « parallel in-register ». Cependant la structure a haute résolution de ces fibres de PrP (23-144) n'a pas pu être déterminée (Helmus *et al*. 2008).

Plus récemment une structure a haute résolution de fibres amyloïdes de PrP recombinante de pleine longueur a été résolue par cryo-microscopie électronique (cryo-ME). Les auteurs ont construit sans ambiguïté un modèle comprenant les résidus 170-229 avec une résolution moyenne de 2,7 Å. D'après leur étude chaque fibre est composée de deux protofilament entrelacés, disposés en quinconce et formant une hélice gauche. Chaque protofilament est constitué d'un empilement de sous-unité de PrP avec une hauteur de 10,8 Å ce qui correspond à une molécule de PrP par couche. Chaque molécule de PrP comprend 6 feuillets bêta dans la région 170-229 séparés par des boucles plus au moins longues. Un pont salin existe entre les résidus Lys194 d'un monomère et Glu196 sur le monomère opposé à l'interface des deux protofilaments, chaque monomère créant une cavité qui pourrait être importante pour la stabilité des fibres. Finalement tout comme pour les fibres décrites plus haut la structure 170-229 correspond au modèle « parallel in-register ». En dépit des informations précieuses qu'apporte cette étude il est important de rappeler que cette structure ne décrit pas la totalité de la molécule, qu'elle ne représente peut-être qu'une conformation parmi d'autres étant donné l'hétérogénéité structurale des fibres de PrP et que l'infectivité des fibres n'a pas été évaluée (Wang *et al*. 2020).

5. La neurotoxicité des prions

5.1. PrP^{Sc} et toxicité

Malgré les importantes avancées réalisées dans l'étude des maladies à prion, les mécanismes par lesquels ils provoquent la mort neuronale restent mal compris. Cette neurotoxicité peut être expliquée de plusieurs manières.

5.1.1. Perte des fonctions de la PrP^{C}

La première théorie consiste à dire que la PrP^{C} recrutée et convertie dans sa forme PrP^{Sc} n'est plus en mesure de remplir sa ou ses fonctions physiologiques ce qui entrainerait la mort neuronale. En effet comme décrit précédemment la PrP est impliquée dans différentes fonctions dont la transduction du signal cellulaire, le fonctionnement des synapses, et la myélinisation, entre autres. Il se pourrait donc que la perte de ces fonctions entraine diverses complications. Cependant les souris qui n'expriment pas la PrP sont essentiellement normales (Bueler *et al*.

1992). Nous pourrions alors supposer que l'absence de PrP^{C} durant le développement embryonnaire entraine le développement de mécanismes permettant de compenser la fonction de la PrP, cette hypothèse est toutefois en contradiction avec le fait qu'une déplétion post-natale de la PrP n'entraine pas non plus de neurodégénérescence (Malluci *et al*. 2002).

5.1.2. Toxicité de la PrP^{Sc}

Une deuxième hypothèse serait que la PrP^{Sc} ou la PrP^{Res} résultante serait neurotoxique, cette théorie se base d'abord sur le fait que l'accumulation de PrP^{Sc} précède généralement la perte neuronale et que souvent les structures cérébrales les plus riches en PrP^{Sc} sont les plus affectées lors des maladies à prion (Williams *et al*. 1997). Cette théorie est soutenue par plusieurs expériences réalisées *in vitro*, l'exposition de cellules corticales de rat en culture primaire a de la PrP^{res} entraine l'apparition de nombreux signes apoptotiques (Müller *et al*. 1993), l'incubation de cellules de neuroblastome N2a avec de la PrP^{Sc} purifiée à partir de cerveaux de souris infectées provoque un stress du RE et l'activation de la caspase 12 (Hetz *et al*. 2003) et l'infection chronique de cellules GT-1 et N2a avec de la PrP^{Sc} provoquerait une certaine inhibition du protéasome et l'induction d'une voie apoptotique *via* la stimulation des caspases 3 et 8 (Kristiansen *et al*. 2005).

5.1.3. Hypothèse de l'intermédiaire toxique

Cependant même cette possibilité ne satisfait pas toutes les observations faites au niveau expérimental. D'abord dans un certain nombre de cas la présence de grande quantité de PrP^{Sc} n'est pas corrélée avec la présence d'une neurotoxicité dans le cerveau, ensuite la PrP^{Sc} n'est pas directement toxique pour les neurones qui n'expriment pas la PrP^{C} (Collinge et Clarke. 2007) et finalement la suppression de l'expression de la PrP^{C} au cours d'une maladie a prion si elle est effectuée précocement protège complétement les souris infectées et provoque même une régression de la spongiose. Ainsi les souris survivent, alors que les niveaux de PrP^{Sc} dans le cerveau restent aussi élevés qu'au stade terminal de la maladie (Malluci *et al*. 2003 ; 2007). Cette dernière observation est d'ailleurs en défaveur des deux premières hypothèses.

En raison de ces contradiction une troisième hypothèse a émergée. La toxicité pourrait ne pas être portée par la PrP^{Sc} mais plutôt par des oligomères plus petits et plus labiles appelés PrP^{L}. Dans ce modèle la PrP^{Sc} infectieuse agit comme un catalyseur formant ces intermédiaires

toxiques qui murissent ensuite produisant de la PrP^{Sc} non toxique. La neurotoxicité est constatée lorsqu'une concentration critique de PrP^{L} est atteinte, l'évolution de la concentration de la PrP^{L} dépendra dans ce cas à la fois de la concentration du catalyseur (PrP^{Sc}) et du substrat (PrP^{C}). En partant de ce principe les cas présentant une grande quantité de PrP^{Sc} mais pas de signes cliniques seraient due à une conversion de la PrP^{L} en PrP^{Sc} qui serait plus rapide que sa formation ne permettant pas l'accumulation de l'espèce toxique, par contre dans les maladie avec un temps d'incubation court comme lors de l'infection des souris tg20 avec le prion RML on observe au contraire une formation rapide de PrP^{L} et une conversion plus lente vers la PrP^{Sc} permettant l'accumulation de l'espèce toxique et une mort prématurée (Collinge et Clarke. 2007).

Cette théorie est non seulement en accord avec les expériences citées précédemment mais en plus une certaine toxicité d'oligomères de PrP a été observée *in vivo* et *in vitro*. Une toxicité des oligomères de PrP a été observée sur une culture primaire de neurones corticaux de souris, l'exposition des neurones aux oligomères aboutit à 50% de mort cellulaire que les neurones expriment ou non la PrP^{C}, sur ces mêmes neurones ni les fibres de PrP ni la PrP monomériques ne sont toxiques. Fait intéressant, faire évoluer les oligomères vers des fibres amyloïdes ThT positives aboutit à la perte de leur toxicité ce qui concorde avec la théorie des intermédiaires. Les oligomères inoculés par injection stéréotaxique se sont aussi avérés toxique sur des souris exprimant ou non la PrP. Les fibres de PrP présentent une toxicité *in vivo* moins importante et la PrP monomérique n'est pas toxique (Simoneau *et al*., 2007).

5.2. Mécanismes impliqués dans la mort neuronale

En plus de l'ambiguïté qui existe vis-à-vis de l'origine de la toxicité des prions il semble que plusieurs voies sont potentiellement impliquées dans la neurotoxicité.

Une des voies suspectées est l'apoptose, comme cité précédemment l'activation de plusieurs caspases a été observée lors de l'incubation de cellule en présence de PrP^{Sc}, de plus la présence d'une fragmentation de l'ADN un marqueur de l'apoptose a été détectée (Müller *et al*., 1993 ; Hetz *et al*., 2003 ; Kristiansen *et al*., 2005)

L'observation d'un accroissement du nombre d'autophagosomes dans les cerveaux infectés par une ESST a amené certains chercheurs à proposer l'autophagie comme origine de la

neurodégénérescence (Liberski, Gajdusek, et Brown 2002 ; Liberski *et al*., 2004; Zhou *et al*., 2012). La PrP^C a été impliquée dans la répression de l'autophagie dans les neurones (Oh *et al*., 2008), ainsi la perte de fonction de la PrP^C pourrait favoriser une augmentation de l'autophagie durant une ESST. Cependant d'autres études proposent qu'au contraire l'autophagie jouerait un rôle neuroprotecteur en dégradant la PrP^{Sc} intracellulaire. En effet la stimulation de l'autophagie dans des cellules neuronales ou non provoque une augmentation de la clairance de la PrP^{Sc} (Ertmer *et al*., 2004 ; Heiseke *et al*., 2009 ; Aguib *et al*., 2009).

Le stress du réticulum endoplasmique est une autre voie possible. En effet, un changement dans l'homéostasie du calcium Ca2+ a été décrit dans plusieurs neuropathologies, dont les maladies à prions or ce dysfonctionnement induit un stress du RE (Hetz *et al*. 2003). Le stress du RE active l'Unfolded Response Protein (UPR), qui est une voie neuroprotectrice permettant de diminuer transitoirement la synthèse protéique afin d'assurer la survie de la cellule (Halliday et Mallucci. 2014). Mais si elle est maintenue activée en permanence cette voie UPR déclenche à terme l'apoptose et elle est suractivée dans les maladies à prions. De plus chez les souris infectées, l'inhibition de l UPR est associée à une augmentation du temps de survie et à une atténuation des signes cliniques (Moreno *et al*. 2013)

6. Les modèles expérimentaux de réplication des prions

6.1. Les modèles animaux

Différents modèles animaux ont été utilisés dans l'étude des maladies à prion, ces modèles se sont avérés très efficaces dans l'étude de la physiopathologie de la maladie et ont permis le titrage de l'agent infectieux et de mesurer ses effets selon la voie d'inoculation. Ils ont aussi permis d'étudier le phénomène de barrière d'espèce, de déterminer le degré de susceptibilité de l'hôte aux différents prions et sont des outils essentiels dans la recherche de molécules thérapeutiques.

Les modèles les plus largement utilisés sont les modèles murins notamment la souris, le rat, le campagnol roussâtre et le hamster doré qui ont tous été capables de répliquer la tremblante des petits ruminants (Chandler., 1961 ; Chandler., 1971 ; Chandler et Fisher., 1963). D'ailleurs les expériences réalisées sur le hamster doré ont énormément contribué à la compréhension des mécanismes de la maladie et à l'identification de la nature protéique de l'agent pathogène

(Prusiner *et al*., 1980 ; Kraus *et al*., 2021). D'autres animaux qui se sont avérés très efficaces dans l'étude des maladies à prion sont les primates non humains. Ainsi une transmission expérimentale de prion a pu être effectuée chez des lémuriens, des macaques, des singes écureuils et des chimpanzés (Bons *et al*., 1999 ; Gibbs *et al*., 1994 ; Lasmézas *et al*., 2005 ; Williams *et al*., 2007). Cependant parmi les modèles cités ci-dessus le plus utilisé dans l'étude de la propagation des prions *in vivo* est la souris. Cette préférence se justifie par la présence d'outils permettant la manipulation de leur génome, leur facilité d'entretien et par les temps d'incubation relativement court observés lors des infections par les prions (Kimberlin et Walker., 1977).

Les animaux sont en général facilement inoculables grâce aux pouvoir infectieux des prions. Classiquement pour un test effectué sur des souris sauvages on réalise une inoculation intracérébrale d'un agent infectieux adapté à la souris (Chandler., 1961), il s'en suit une phase d'incubation dont la durée varie en fonction de la souche et de la dose. Les animaux développent ensuite des signes cliniques caractéristiques d'une maladie a prion dont l'issue est toujours mortelle. Les cerveaux prélevés sur les souris présentent alors des caractéristiques neuropathologies propres aux ESST (spongiose, dépôts de PrP^{sc} et gliose astrocytaire). L'utilisation d'autres voies d'inoculation notamment au niveau périphérique reste possible mais est souvent associée à des phases d'incubation plus longues. Cependant ces essais bien que fiables présentent des temps d'incubation qui restent assez long mais qui peuvent être considérablement réduit par l'utilisation de souris transgéniques surexprimant la PrP (Carlson *et al*. 1994).

La création de lignées de souris transgéniques a énormément contribué à l'études des maladies à prion. Les souris dépourvues du gène murins *Prnp* qui a été invalidé (souris Knock out) mais qui expriment la PrP d'une autre espèce introduite par transgénèse additionnelle ont été très utiles pour étudier les prions de bon nombre d'autres espèces de mammifères et permettre l'isolement de souches spécifiques. Ainsi les souris exprimant la PrP humaine se sont avérées sensibles a des souches de MCJ (Telling *et al*., 1994 ; Telling *et al*., 1995) et puis des constructions avec l'un ou l'autre des deux allèles au codon 129 ont été générées telles que les souris Tg152 (129V), Tg35 (129M, expression deux fois plus importante que chez l'Homme) ou Tg650 (129M, six fois) (Asante *et al*., 2002 ; Bishop *et al*., 2006 ; Béringue, Le Dur, *et al*., 2008). Les souris exprimant la PrP bovine sont sensible aux souches d'ESB (Vilotte *et al*., 2001 ; Scott *et al*., 1997 ; Buschmann *et al*., 2000) et les souris transgéniques (Tg 338) surexprimant

la PrP ovine ont même permis la première transmission expérimentale de la tremblante atypique Nor98 (Le Dur *et al*., 2005).

Enfin les souris transgéniques exprimant des PrP mutées représentent des modèles animaux adéquat pour l'étude de l'effet de mutations liées à des ESST humaines mais aussi pour l'étude des mécanismes régissant l'apparition et le développement des maladies à prion de façon plus globale. Ainsi des souris exprimant une PrP dépourvue de la partie amino-proximal se sont avérées sensibles aux prions suggérant que cette partie n'est pas requise pour la conversion vers la forme PrP^{Sc} (Fischer *et al*., 1996 ; Flechsig *et al*., 2000). Une lignée murine surexprimant une PrP portant la mutation P102L (associée à une GSS chez l'homme) semble développer spontanément une maladie et présente des dépôts de PrP^{Sc} au niveau du cerveau (Telling, Haga, *et al*., 1996 ; Hsiao *et al*., 1990 ; Nazor *et al*., 2005). C'est aussi le cas pour des souris transgéniques exprimant d'autres PrP humaines avec des mutations familiales ou des PrP d'autres espèce avec des mutations analogues (Watts et Prusiner., 2017) mais aussi des souris surexprimant une PrP dépourvue d'ancre GPI (Stöhr *et al*., 2011) ou un allèle particulier du campagnol roussâtre (Watts *et al*., 2016)

6.2. Les modèles cellulaires :

Plusieurs types de modèles cellulaires permissifs à la réplication des prions ont été élaborés pour faciliter les études des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les infections à prions telles que : l'importance des modifications post traductionnelles de la PrP, l'étude du trafic de la PrP^{C} ou de la PrP^{Sc}, l'identification des sites de réplication, la recherche des partenaires protéiques et voies de signalisation, la toxicité des prions. Ces cellules ont aussi aidé à déterminer l'importance relative des différentes régions de la PrP pour la conversion de la protéine en prion et permis de tester les effets de nombreuses modifications de la séquence primaire de la PrP. Elles ont été utiles et le seront surement encore pour le criblage de molécules anti-prion. D'un point de vue pratique même si l'utilisation des modèles animaux reste incontournable pour l'aspect neuropathologique des ESST, l'étude des prions propagés en culture de cellule exige un moindre investissement de temps et des couts moins élevés et peut aider à réduire l'utilisation d'un grand nombre d'animaux notamment lorsque les effets de séries de mutations sont étudiés (Solassol *et al*., 2003 ; Vilette, 2008).

L'approche classique pour une infection de cellules en culture consiste à cultiver les cellules en présence de fractions infectieuses comme des homogénats de cerveaux infectés. L'efficacité de l'infection est évaluée en constatant la présence de PrP^{Sc} qui peut être distinguée de la PrP^{C} par un traitement a la protéinase K. L'inoculation d'un animal avec les lysats cellulaires permet aussi d'évaluer le caractère infectieux du prion propagé sur les cellules (Clarke et Haig., 1970 ; Villette., 2001)

Une donnée importante est que quelle que soit l'origine des cellules permissives considérées, les prions propagés en culture de cellule conservent en général les caractéristiques propres de la souche infectante, même après plusieurs passages des cultures. Ainsi lorsque les prions qui se sont répliqués dans les cellules sont inoculés à leur tour dans le même animal que celui d'origine, on retrouve les mêmes manifestations cliniques, les mêmes profils électrophorétiques, une période d'incubation et les profils pathologiques identiques à celle de la souche avec laquelle les cellules ont été infectées (Archer *et al.*, 2004 ; Arima *et al.*, 2005 ; Munoz-Montesino *et al.*, 2016).

6.2.1. Les cultures primaires et autres systèmes *ex vivo*

L'utilisation des cultures cellulaires primaires est une étape importante vers la compréhension de la biologie cellulaire dans un organisme entier.

6.2.1.1. Les cultures primaires de neurones en grain du cervelet

Ces cultures primaires ont été choisies car on peut obtenir des quantités suffisamment importantes de neurones pour travailler mais aussi et surtout parce qu'ils survivent plus longtemps que la plupart des autres neurones en culture, le facteur temps étant crucial pour obtenir une multiplication significative des prions dans ces cellules post-mitotiques. Le développement de cultures primaires de cellules neuronales permissives a la réplication des prions a été réalisé à partir de souris tg338 surexprimant la PrP^{C} ovine (Vilotte *et al.*, 2001). Ces cultures primaires ont été facilement infectées par des prions ovins (Cronier, Laude et Peyrin., 2004). Plus tard des cultures équivalentes ont été mises en place à partir de lignée de souris transgéniques surexprimant la PrP murine, de hamster, ou même humaine. Elles ont été utiles pour l'études des mécanismes impliqués dans la propagation et la neurotoxicité des

prions et la réponse des cellules infectées aux molécules anti-prion (Cronier *et al*., 2007 ; Cronier *et al*., 2012 ; Hannaoui *et al.,* 2013 **;** Huin et cronier 2020).

6.2.1.2. Les cultures d'astrocytes

Les cultures primaires d'astrocytes dérivées de cerveau de souris surexprimant la PrP ovine se sont aussi avérées très permissives aux prions (cronier *et al*., 2004). Les astrocytes dérivés de cellules souches humaines pluripotentes (« induced pluripotent stem cells » (iPSCs) sont permissifs à la réplication de prions provenant de cerveaux de patient CJD. Une réplication de la forme variante du CJD dépendant du génotype au codon 129 (MM, versus MV ou VV) comparable à celle observée chez l'homme a été observée sur ces cellules. (Krejciova *et al*., 2017).

6.2.1.3. Coupes de cervelet, neurosphères et agrégats organoides

Les méthodes qui permettent la réplication des prions *ex vivo* sont importantes pour progresser dans la connaissance des prions et des pathologies associées. Les coupes ou tranches de tissus cérébraux à partir du cervelet de souris transgéniques ont pu être maintenues en culture sur de relativement longues périodes (Falsig *et al*., 2008). Elles ont été efficaces pour la réplication de différent prion de souris, bovins et ovins. Elles ont permis une amplification des prions dans des conditions qui se rapproche de celles d'une infection cérébrale, les différentes populations de cellules étant représentées, et une certaine spongiose a même été notée (Falsig *et al*., 2012). Ces cultures de tranches organotypiques de cervelet se sont avérées très sensibles à l'infection (Halliez *et al*., 2014).

Les prions murins ont aussi pu être propagés dans des « neurosphères » qui sont des groupes de cellules précurseurs neurales partiellement, mais pas complètement différenciées, isolés à partir d'embryon et qui sous certaines conditions s'agrègent en boules non adhérentes au support et qui s'entretiennent et se multiplient par passage en culture (Giri *et al*., 2006). Des agrégats cérébraux embryonnaires contenant des neurones et des cellules gliales ont également été permissifs aux prions de souris et des inhibiteurs des gamma sécrétases ou de la quinacrine ont stoppé la réplication des prions et la dégénérescence des dendrites, mimant ainsi les effets obtenus dans les études sur l'animal (Bajsarowicz *et al.,* 2012 ; Tousseyn *et al*., 2015). Un certain degré de différentiation cellulaire est probablement déterminant pour le succès des

infections dans ces regroupements de cellules. Des organoïdes cérébraux humains ont permis récemment la propagation de prions CJD dans des cultures 3D (Groveman *et al*., 2021) et des systèmes de reconstitution cellulaires neurones /astrocytes/cellules microgliales permettent d'étudier les interactions entre les différentes cellules infectées par les prions (Kushwaha *et al*., 2021)

6.2.2. Les lignées cellulaires continues susceptibles aux prions

Le principal problème rencontré avec les toutes premières lignées cellulaires capable de propager un prion fut le faible rendement d'infection constaté, notamment pour les cellules de neuroblastes N2a (Race *et al*., 1987). Des sous-clonages et/ou une surexpression de la PrP^{C} ont permis d'obtenir des lignées Na2 avec un rendement et une stabilité d'infection très significativement augmenté (Bosque et Prusiner, 2000 ; Nishida *et al*., 2000). Ces cellules N2a font maintenant partie des modèles cellulaires les plus utilisés dans l'étude de la propagation des souches expérimentales adaptés à la souris. Mais de façon générale relativement peu de lignées cellulaires se sont avérées permissives aux prions.

La plupart de ces lignées qui peuvent être infectées par des prions sont des lignées neuronales de rongeurs, principalement de souris, qui permettent la propagation de différentes souches de prion (généralement préalablement adaptés aux rongeurs). Elles comprennent entre autres la lignée **SMB** (Scrapie Mouse Brain) dérivée de cerveau de souris infectées par la souche Chandler, la lignée de neuroblastome de souris **N2a**, la lignée de cellules neuroendocrine **GT1**, la lignée de cellule souche neuroectodermique **1C11** qui peut être différenciée en différents type de neurones en culture, la lignée de cellules de phéochromocytome de rat **PC12** et la lignée de neurones catécholaminergique du system nerveux central **CAD** (Butler *et al*., 1988 ; Clarke et Haig, 1970 ; Clarke et Millson, 1976 ; Magalhães *et al*., 2005 ; Mouillet-Richard *et al*., 2000 ; Qi *et al*., 1997 ; Rubenstein *et al*., 1984 ; Schätzl *et al*., 1997). Récemment l'édition de la lignée **CAD5** a permis de supprimer les gènes de la PrP et d'obtenir une lignée KO $PrP^{0/0}$ qui une fois reconstituée avec les gènes de la PrP de souris, de hamster, de bovin, campagnol ou de cervidé est devenue susceptible à l'infection par les prions de chacune des espèces correspondantes (Walia *et al*., 2019 ; Bourkas *et al*., 2019)

Les lignées de cellules non neuronales se sont elles aussi avérées capables de propager efficacement certains prions. Parmi ces lignées on retrouve notamment les lignées de cellules

de schwann telles que **MovS** issues de ganglions de souris transgéniques Tg338 exprimant la PrP ovine (Vilotte) ou la lignée murine MSC-80 (Archer *et al*., 2004 ; Follet *et al*., 2002). On trouve également des lignées d'origine microgliale : MG20 dérivées de souris TG20 surexprimant la PrP murine ou des clones issus d'une lignée microgliale ovine immortalisée (Iwamaru *et al*., 2007, Dinkel *et al*., 2017).

Dans l'optique de développer un outil efficace pour l'étude des prions ovins en culture de cellule notre équipe a développé une lignée de cellules épithéliale surexprimant le PrP^C ovine (Courageot *et al*., 2008 ; Paquet *et al*., 2007 ; Vilette, 2008 ; Vilette *et al*., 2001). La lignée de cellules épithéliales de rein de lapin **RK13** fut la première lignée infectable par un isolat naturel de tremblante, c'est à dire par un isolat non adapté préalablement aux rongeurs. Les cellules RK13 n'exprimant pas naturellement la PrP, la simple expression de la PrP ovine dans ces cellules a donc suffi à permettre leur infection. Une fois infectées les cellules ne montrent cependant aucun signe d'apoptose ni de mort cellulaire (Courageot *et al*., 2008). Les cellules RK13 sont particulièrement susceptibles à l'infection par les prions car transfectées avec une PrP de souris, de campagnol, et de cervidé elles se deviennent susceptibles aux prions issus des espèces correspondantes (Lawson *et al*., 2008 ; Vilette 2008, Bian *et al*., 22010) Mais surtout l'absence d'expression de la PrP permet de faire de la génétique inverse et donc de tester l'effet de mutations introduites dans la PrP sur son trafic ou sur sa conversion en prion (Salamat *et al*., 2013, Munoz *et al*., 2016). Par ailleurs d'autres travaux ont montré une infection productive sur des lignées communément utilisées en laboratoire pour d'autres études comme les lignées NIH3T3 et L929 (Mahal *et al*., 2007) En conclusion l'infection des lignées non neuronales indiquent que les prions peuvent infecter plusieurs types de cellules en culture n'ayant pas de lien avec le système nerveux indiquant que des facteurs propres aux neurones ou aux astrocytes ne sont pas indispensables à la réplication des prions.

6.3. Amplification *in vitro*

6.3.1. « Cell free conversion assay »

Le premier modèle de réplication cellulaire fut mis au point par l'équipe de Byron Caughey, l'expérience consiste à mettre en contact de la PrP^{Sc} purifiée à partir de cerveaux d'animaux infectés avec de la PrP^C marquée au souffre radioactif produite par des cellules en culture. Ce système a permis une conversion de la PrP^C avec un taux allant de 10 à 20% ce qui reste

relativement modeste (Kocisko *et al*. 1994), ce résultat peut cependant être amélioré par l'ajout de la protéine chaperonne Hsp 60 (Debburman *et al*. 1997). Ce premier modèle c'est montré sensible aux phénomènes de souche et de barrière d'espèce mais incapable de démontrer la présence de PrP^{Sc} infectieuse néosynthétisée *de novo* (Horiuchi *et al*., 2000 ; Hill, Antoniou, et Collinge., 1999).

6.3.2. « Protein Misfolding Cyclic Amplification » (PMCA)

Plus tard l'équipe de Claudio Soto a élaboré une technique plus complexe et plus efficace la PMCA. Le principe de la technique ressemble à celui de la PCR et repose sur l'amplification d'une très faible quantité de PrP^{Sc} qui sert d'amorce (seed) grâce à la présence de PrP^{C} à une concentration bien supérieure qui sert de substrat à la conversion. La réaction se fait en présence de triton à 1% et les substrats les plus efficaces sont les homogénats de cerveaux à 10% mais on peut aussi parfois utiliser des lysats de cellules qui expriment fortement la PrP^{C} ou même de la PrP^{C} purifiée. Un cycle de PMCA comprend deux phases : une longue phase d'incubation (30 minutes) qui permet le recrutement et la conversion de la PrP^{C} par la PrP^{Sc} et une courte phase de sonication (30 secondes) qui permet la fragmentation des oligomères ou polymères néoformés afin de générer un maximum de noyaux de polymérisation, multipliant ainsi les sites de conversions disponibles. Ces cycles sont répétés pour amplifier de manière exponentielle la quantité de PrP^{Sc} formée qui est proportionnelle au nombre de cycles effectué tant qu'une quantité suffisante de substrat est disponible (Saborio, Permanne, et Soto 2001). Typiquement 24 à 48 cycles sont nécessaires pour obtenir des rendements optimums de conversion de la PrP^{C} en PrP^{Sc} qui peuvent atteindre jusqu'à 50% du taux de PrP^{C} utilisé dans la réaction. A la fin la réaction de PMCA, l'échantillon peut- être dilué et on peut recommencer une série de cycles qui peut être suivie par plusieurs autres si nécessaire jusqu'à pouvoir amplifier des quantités infimes de PrP^{Sc} de départ. Même si cette procédure est très efficace pour la plupart des prions, toutes les souches ne s'amplifient pas aussi facilement et certaines souches humaines sont difficiles à amplifier. Dans certains cas la PMCA a même permis d'amplifier des prions particuliers avec de la PrP recombinante et l'addition de cofacteurs (Eraña *et al*., 2019). En plus de sa sensibilité la PMCA possède l'avantage de former de la PrP^{Sc} infectieuse pour les modèles animaux et qui conserve les propriétés de la souche ayant servie d'amorce notamment en reproduisant fidèlement les signes cliniques et les patterns de vacuolisations (Castilla *et al*. 2005 ; Weber *et al*. 2006). Depuis sa création la PMCA s'est avérée utiles dans diverses applications, on peut prendre pour exemple son utilisation dans la comparaison de plusieurs

procèdes de décontamination des Prions (Belondrade *et al*., 2016), ou encore son application éventuelle en tant que technique de détection ante mortem (Bougard *et al*., 2016).

6.3.3. « Quaking-Induced Conversion » (QuIC)

Le QuIC est une technique dérivée de la PMCA mise au point par l'équipe de Caughey en 2008. Cette technique consiste toujours dans l'amplification d'un seed de PrP^{Sc} mais en utilisant comme substrat de la PrP recombinante et en remplaçant la phase de sonication par une agitation à grande vitesse. La technique est très sensible et a même permis la détection de PrP^{Sc} dans des sécrétions nasales de hamster (Atarashi *et al*. 2008 ; Bessen *et al*. 2010 ; Orru *et al*. 2009). Une variante de cette technique est la RT-QuIC qui consiste à ajouter dans le milieu réaction de la thioflavine T (ThT) un fluorophore dont la fluorescence augmente en présence de structures amyloïdes. Le suivi de l'évolution de la fluorescence au court du temps permet ainsi de suivre en temps réel la conversion de la PrP^{C} (Wilham *et al*. 2010). Les améliorations récentes de cette technique en ont fait un outil extrêmement sensible pour la détection de quantité infime de PrP^{Sc} et très efficace pour le diagnostic des cas de CJD notamment à partir du liquide céphalo rachidien (LCR) (Mok *et al*., 2021 ; Dong et Satoh., 2021).

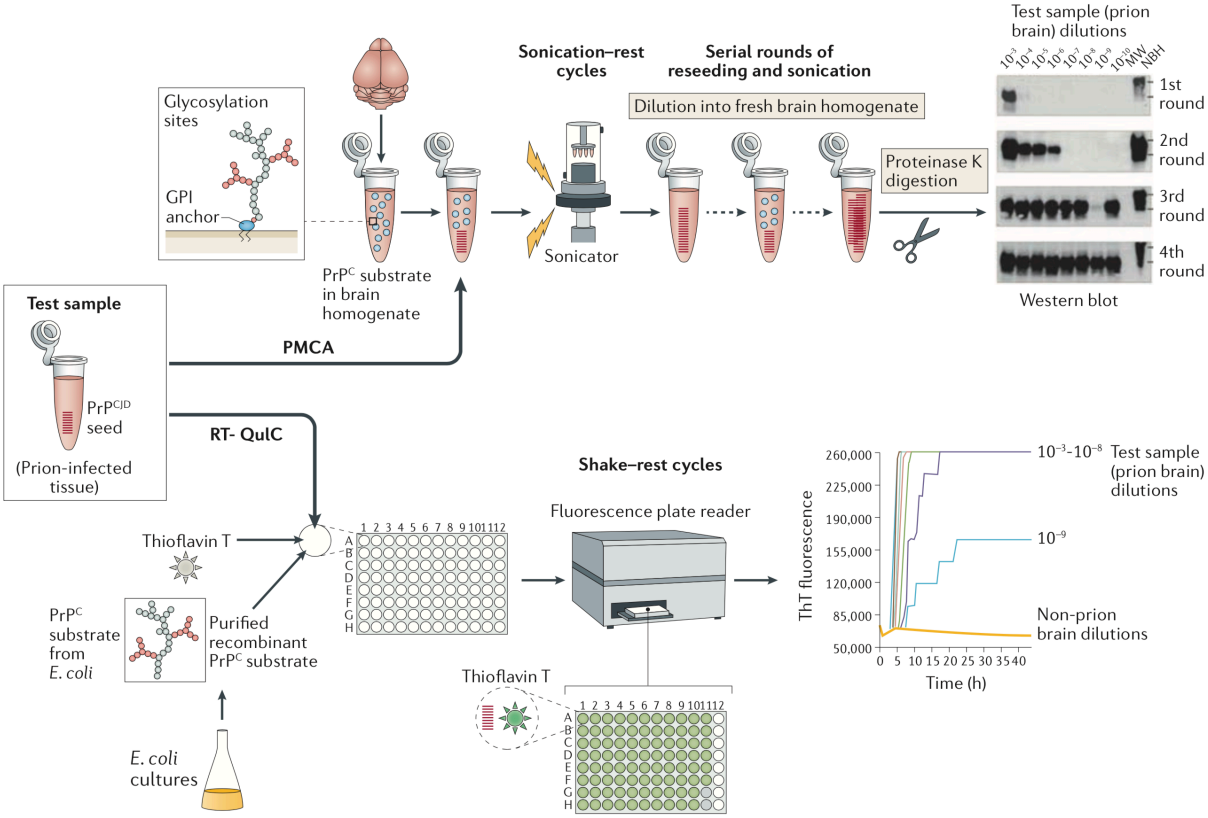

Figure 12 : Principes de fonctionnement de la PMCA et de la RT-QuIC (Zanusso *et al.*, 2016).

II. Objectif

L'objectif général de cette thèse est de contribuer à l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et la réplication des prions de mammifères et cela à travers l'étude détaillée d'une PrP mutante et de sa forme prion.

Plus spécifiquement le premier objectif a été d'établir les bases d'un modèle cellulaire permettant la formation spontanée d'un prion en culture cellule et de caractériser ce prion. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation spontanée des prions restent mal connus et développer un modèle cellulaire de prion spontané devrait permettre de faire progresser les connaissances dans ce domaine.

Le second objectif consistait à introduire la mutation responsable de la formation spontanée du prion dans une PrP recombinante produite en bactérie pour pouvoir synthétiser des fibres amyloïdes de cette PrP mutante *in vitro* et de tester leur infectivité sur des cellules en culture. Des fibres amyloïdes de PrP capables d'induire une transconformation de la protéine cellulaire constitue un matériel de choix pour aborder une étude structurale de molécules avec une activité de type prion.

Le troisième objectif spécifique était l'étude par spectroscopie RMN du solide de la structure de fibres amyloïdes de PrP mutante qui s'étaient comportées comme des prions synthétiques. La mutation imposée à la PrP se situant en plein cœur de la partie rigide, riche en feuillet beta, la structure des « fibres mutantes » pouvait présenter des caractéristiques particulières permettant de faire progresser la connaissance des relations structures-fonctions des prions.

III. Résultats

Partie 1 :

Une délétion dans la PrP induit la génération d'un prion spontané d'un nouveau type en culture de cellule.

1. Introduction de la partie 1

Le concept prion s'applique à un élément protéique qui peut se retrouver sous deux conformations très différentes, l'une de ces deux formes, la forme dite prion, étant capable de convertir l'autre forme par simple contact en lui faisant adopter sa propre structure. L'archétype en est le prion des mammifères qui est responsables de maladies neurodégénératives transmissibles chez l'homme et l'animal. Les agents pathogènes que sont les prions sont la conséquence d'un mauvais repliement de la forme physiologique et native de la protéine Prion cellulaire (PrP^{C}). Cette glycoprotéine ancrée à la surface des cellules possède un domaine globulaire alpha hélical et une extrémité NH2 terminale flexible (Prusiner., 2013 ; Zahn *et al*., 2000). Sa forme prion au contraire est riche en feuillet beta, insoluble et partiellement résistante aux protéases. Elle est appelée PrP^{Sc} en référence à son identification originelle dans les prions provenant de la tremblante du mouton (« scrapie » des anglo-saxons) (Prusiner., 1982). Ce sont les deux-tiers de la partie COOH terminale (aa 80/100 – C-term), désignés comme le fragment C2 qui forment la partie résistante aux protéases et correspondent au domaine PrP nécessaire et suffisant à la réplication des prions (Chen *et al*., 1995 ; Fischer *et al*., 1996). Le fragment dit C1 de la PrP^{C} correspond quant à lui à une coupure de la partie N-terminale de la protéine native par les métalloprotéases cellulaires, principalement au niveau des acides aminés 110-111 ou 111-112 pour la PrP humaine (équivalents 113-114 ou 114-115 pour la PrP ovine) (Dickinson *et al*., 1968 ; Mange *et al*., 2004). Ce fragment naturel C1 n'est pas converti en prion par les souches classiques de prion et a donc jusqu'à présent été considéré comme trop court pour former une structure de type prion, même s'il contient tout le domaine globulaire alpha hélical

de la PrP^C et qu'il est présent simultanément à la protéine entière à la surface des cellules (Shmerling *et al* 1998 ; Westergard *et al*., 2011).

Les prions peuvent apparaître spontanément, comme dans les cas sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) c'est-à-dire sans qu'il y ait eu à priori d'infection ou de contamination par un prion préexistant. Dans ce contexte, l'apparition spontanée du prion nécessite tout d'abord la formation de noyaux de PrP^{Sc} suffisamment stables pour initier le processus de polymérisation, ce qui correspond à une étape lente et limitante (Cobb et Surewicz., 2009). En effet, les maladies à prion spontanées correspondent à un événement rare, la prévalence de la MCJ sporadique étant d'environ 1,5 cas par million d'habitants et par an. Par contre un certain nombre de mutations dans la PrP favorisent sa conversion spontanée en prions. Plus de 30 mutations responsables de maladies à prion humaines incluant la MCJ familiale, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), ou l'insomnie fatale familiale, ont été identifiées, et ces mutations alléliques dominantes présentent généralement une forte pénétrance (Mead *et al*., 2019). Il s'agit essentiellement de substitutions mais on trouve également des insertions dans la région des répétitions de l'octapeptide. Ces mutations favorisent la conversion de la protéine native vers une forme prion en introduisant des modifications souvent subtiles dans la conformation de la PrP (Gregor *et al*., 2010, Biljan *et al*., 2013) qui peuvent quand même entrainer dans certains cas une réduction de la stabilité de la protéine (Hadzi *et al*., 2015).

Les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition spontanée des prions restent mal connus. Les modèles murins transgéniques permettant la formation de prions spontanés se sont avérés difficiles à obtenir mais ont quand même été réalisés pour certaines formes mutantes de PrP humaine, murine ou bovines (Torres *et al*. 2013 ; Jackson *et al*., 2013 ; Friedman-Levi *et al*., 2011 ; Watts *et al*., 2017 ; Stöhr *et al*., 2011 ; Watts *et al*., 2016).). Les caractéristiques typiques de la maladie n'ont pas toujours été reproduites chez la souris et, chose intrigante, dans plusieurs cas, ces prions ont montré une résistance plutôt faible à la digestion par les protéases (Watt et Prusiner., 2017). Par ailleurs on a observé que des prions se formaient spontanément dans les souris transgéniques surexprimant une PrP murine dépourvue de son ancre GPI, ou une PrP de campagnol avec un allèle particulier (I109) (Stohr *et al*., 2011 ; Watt *et al*., 2016). Malgré cela l'introduction dans les cellules en culture de PrP humaines mutées ou de PrP d'autres espèces avec des mutations équivalentes s'est avérée décevante jusqu'à présent. Il parait pourtant important de mettre au point un modèle cellulaire de formation spontanée des

prions pour étudier ce processus. Il faut pour cela un système cellulaire permissif à la réplication des prions et avec lequel il soit possible de faire de la génétique inverse sans interférer avec la PrP endogène. D'où le choix du système Rov, c'est-à-dire des cellules RK13 qui n'expriment pas naturellement la PrP mais qui deviennent susceptibles aux prions lorsqu'elles expriment une PrP exogène. Ensuite pour mettre au point un modèle cellulaire de formation spontanée des prions il faut aussi pouvoir modifier la PrP sans inhiber sa capacité à changer de structure. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes concentrés sur la partie terminale de l'hélice alpha 2 de la PrP, région hautement conservée chez les mammifères et associée à plusieurs mutations pathogènes chez l'homme. Dans un travail récent, nous avions démontré que la délétion du groupe de quatre thréonines dans cette extrémité COOH de l'hélice H2 n'avait pas d'effet inhibiteur, mais au contraire facilitait la réplication de certaines souches de prions ovins difficiles à propager sur la PrP sauvage (Munoz-Montesino *et al*., 2016, 2017).

Nous montrons dans ce travail que la délétion spécifique du segment H2 C-terminal HTVTTTT, qui supprime trois résidus supplémentaires en amont, entraîne une conversion spontanée de la PrP ovine mutante en un nouveau type de prion. Ce prion produit un segment résistant aux protéases plus court que d'habitude, de la taille du C1 qui a été capable d'infecter et de se propager sur des cellules naïves RK13 exprimant seulement le segment C1 de la protéine mutante, sans la présence de la PrP entière. L'importance potentielle de l'extrémité H2 C-terminale pour le maintien de la conformation normale de la PrP^{C} dans la cellule, les spécificités du nouveau prion mutant et la surprenante conversion du fragment C1 muté seront discutés.

2. Résultats de la Partie 1

A seven-residue deletion in PrP leads to generation of a spontaneous prion formed from C-terminal C1 fragment of PrP

Carola Munoz-Montesino [1§#], Djabir Larkem [1§], Clément Barbereau [1‡], Angélique Igel-Egalon [1], Sandrine Truchet [1], Eric Jacquet [2], Naïma Nhiri [2], Mohammed Moudjou [1], Christina Sizun [2], Human Rezaei [1], Vincent Béringue [1], and Michel Dron [1]

[1] Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France

[2] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France

[§] These authors have equally contributed to this work

[#]Present address: Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile

[‡]Present address: MMDN, Univ. Montpellier, EPHE, INSERM, U1198, F-34095 Montpellier, France

A seven-residue deletion in PrP leads to generation of a spontaneous prion formed from C-terminal C1 fragment of PrP

Received for publication, June 8, 2020, and in revised form, July 27, 2020 Published, Papers in Press, August 11, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA120.014738

Carola Munoz-Montesino[1,‡], Djabir Larkem[1,‡], Clément Barbereau[1], Angélique Igel-Egalon[1], Sandrine Truchet[1], Eric Jacquet[2], Naïma Nhiri[2], Mohammed Moudjou[1], Christina Sizun[2], Human Rezaei[1], Vincent Béringue[1], and Michel Dron[1,*]

From the [1]Université Paris–Saclay, l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France, and the [2]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris–Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Edited by Paul E. Fraser

Prions result from a drastic conformational change of the host-encoded cellular prion protein (PrP), leading to the formation of β-sheet–rich, insoluble, and protease-resistant self-replicating assemblies (PrP^{Sc}). The cellular and molecular mechanisms involved in spontaneous prion formation in sporadic and inherited human prion diseases or equivalent animal diseases are poorly understood, in part because cell models of spontaneously forming prions are currently lacking. Here, extending studies on the role of the H2 α-helix C terminus of PrP, we found that deletion of the highly conserved ^{190}HTVTTTT^{196} segment of ovine PrP led to spontaneous prion formation in the RK13 rabbit kidney cell model. On long-term passage, the mutant cells stably produced proteinase K (PK)–resistant, insoluble, and aggregated assemblies that were infectious for naïve cells expressing either the mutant protein or other PrPs with slightly different deletions in the same area. The electrophoretic pattern of the PK-resistant core of the spontaneous prion (Δ^{Spont}) contained mainly C-terminal polypeptides akin to C1, the cell-surface anchored C-terminal moiety of PrP generated by natural cellular processing. RK13 cells expressing solely the Δ190–196 C1 PrP construct, in the absence of the full-length protein, were susceptible to Δ^{Spont} prions. Δ^{Spont} infection induced the conversion of the mutated C1 into a PK-resistant and infectious form perpetuating the biochemical characteristics of Δ^{Spont} prion. In conclusion, this work provides a unique cell-derived system generating spontaneous prions and provides evidence that the 113 C-terminal residues of PrP are sufficient for a self-propagating prion entity.

Mammalian prions are responsible for transmissible spongiform encephalopathies in both humans and animals. Prions result from the misfolding of the host-encoded prion protein (PrP). Under its normal conformation, the cell-surface GPI-anchored PrP (PrP^{C}) presents a globular domain containing three α-helices and two short antiparallel β strands, preceded by an unstructured N-terminal part (1, 2). In contrast, prions are made from assemblies of β-sheet–rich, insoluble, aggregative, and mostly partially protease-resistant PrP conformers called PrP^{Sc} in reference to their original identification in scrapie-infected sheep (3). Prion replication appears to proceed by conversion of the normal protein through templated polymerization (4), which explains not only their propagation in tissues but also their intra- or interspecific infectivity. The high-resolution structure of PrP^{Sc} is not yet resolved, because of inherent difficulties in producing large amounts of purified insoluble assemblies that may nonetheless have some intrinsic heterogeneity with respect to size. Several amyloid models were proposed, and coexistence of different candidate structures has even been suggested (5–7).

The two-third C-terminal part of PrP forming the protease-resistant core of PrP^{Sc}, the C2 fragment, constitutes the domain necessary and sufficient for prion replication (8, 9). Prion strains are identified by their specific biochemical and/or neuropathological features in the same infected host species (10, 11). Strains result from structural differences in three-dimensional or quaternary structure of PrP^{Sc}. The N-terminal border of the C2 fragment is strain-dependent and can vary around amino acid positions 80–100.

A C-terminal fragment called C1 results from the natural cleavage of PrP^{C} by a cellular protease at the α cleavage site, which is between residues 110 and 111 of human PrP (8, 12). C1 is thus smaller than C2 and considered so far too short to be converted into prions, although it encompasses the structured globular domain of the full-length PrPC and is also present at the cell surface (13, 14).

Prions can emerge spontaneously as in sporadic cases of human Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), that is, without evidence of infection or contamination. In this context, prion generation requires at first the formation of nuclei stable enough to initiate the polymerization process, which is expected to be a slow and rate-limiting step (15). Indeed, spontaneous prion disease is a rare event, the prevalence of sporadic CJD being of ~1.5 cases per million per year worldwide. Mutations in PrP can favor PrP spontaneous conversion into prions. Indeed, more than 30 mutations responsible for inherited human prion

This article contains supporting information.

‡These authors contributed equally to this work.
*For correspondence: Michel Dron, michel.dron@inrae.fr.
Present address for Carola Munoz-Montesino: Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.
Present address for Clément Barbereau: Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (MMDN), Université Montpellier, l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, INSERM U1198, Montpellier, France.

© 2020 Munoz-Montesino et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

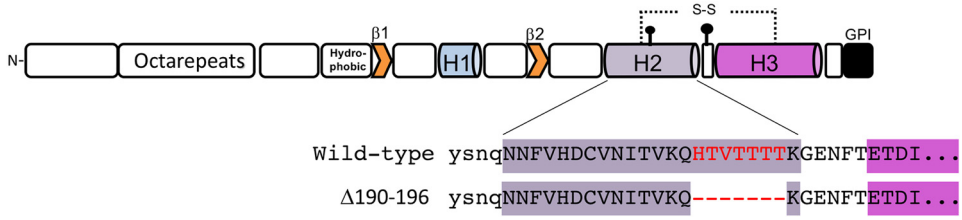

Figure 1. Δ190–196 PrP sequence. On the *top* is the schematic representation of mature ovine PrP^C (positions 23–234). Secondary structures building the globular part of the protein, the two short beta strands forming a beta sheet, and the three α-helices are indicated. Post-translational modifications such as *N*-glycan chains (*black dots*), the disulfide bridge (S–S), and the GPI anchor are also shown. On the *bottom*, the amino acid sequence of α-helix H2 is highlighted in *lavender*, and the first residues of H3 are in *purple*. Residues 190–196 that were removed from the WT PrP are colored in *red* and replaced by a *dotted line* for the deletion mutant.

diseases, including genetic CJD, Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome (GSS), or fatal familial insomnia, were identified, and these dominant allelic mutations usually show a high penetrance (16). Disease-causing mutations might favor partial unfolding or transient denaturation of PrP^C, which are required for refolding into PrP^{Sc}, and might also increase stability of initial PrP^{Sc} seeds.

The cellular and molecular processes underpinning or preventing spontaneous prion generation remain poorly understood. Transgenic mouse models of spontaneous prion formation have proven difficult to obtain. This was achieved for human or mouse PrP bearing some mutations (17, 18). Hallmarks of the disease were not always reproduced in mice, and intriguingly in several instances, prions showed a rather low resistance to protease digestion (19). Prions spontaneously formed in mice overexpressing either anchorless mouse PrP or I109 allele of bank vole PrP (20, 21). Currently, no cellular model for spontaneous prion formation has been reported. Toward this goal we focused here on an intriguing highly conserved threonine-rich region of the α-helix H2 associated with several disease-causing mutations in human PrP (22). In a recent work, we demonstrated that deletion of the cluster of four threonines in the α-helix H2 C terminus has no or marginal effect on ovine prions replication in RK13 cells expressing ovine PrP (23, 24). We now show that specific deletion of the larger H2 C-terminal segment HTVTTTT, which removes three additional residues, causes the spontaneous conversion of the mutant ovine PrP into a new type of prion. This prion exhibits a main protease-resistant core shorter than usual, of C1 size, which was able to infect naïve RK13 cells expressing the mutant C1 segment alone. The potential importance of H2 C terminus for maintenance of normal PrP^C conformation in the cell, the specificities of the new mutant prion, and the surprising conversion of the homologous mutant C1 fragment into a prion entity are discussed.

Results

Δ190–196 deletion does not alter the overall structure of PrP but reduces its stability

We focused here on Δ190–196 ovine PrP (VRQ allelic variant), a mutant PrP with a specific deletion of seven amino acids at the end of helix H2 (Fig. 1). We previously reported that a larger deletion of the H2 C terminus (Δ190–197) did not have a major impact on the structure of the protein, leaving intact the spatial organization of the three α-helices in the globular domain of PrP (23). As with Δ190–197 PrP, structural analysis of recombinant Δ190–196 PrP by CD indicated a conservation of the overall α-helical content compared with WT PrP (Fig. 2*A*). This is in agreement with NMR analysis of the segment 113–214 of Δ190–196 PrP ($C1_{113}$), which contains the entire sequence of the structured domain and is an equivalent to the natural C1 fragment studied hereinafter. The large dispersion of amide chemical shifts observed in the ^1H-^{15}N HSQC spectrum of $^{15}N^{13}C$-labeled mutant $C1_{113}$ indicated that it maintained a globular core, in addition to its unstructured N-terminal region (Fig. 2*B*). Moreover, comparison with the spectra of Δ193–196 and Δ190–197 mutant PrPs previously obtained (23, 24) *versus* WT PrP showed that chemical shift perturbations followed a similar trend, confirming that the structure of the core domain of Δ190–196 $C1_{113}$ is structurally close to those of other mutants (Fig. 2*C*). Last, analysis of Δ190–196 $C1_{113}$ $^{13}C\alpha$ chemical shifts yielded the position of the three α-helices within residues 147–159, 175–189, and 203–230, showing that the topology is conserved with respect to WT PrP (Fig. 2*C*).

The HTVTTTT deletion removed a histidine at position 190, which is the equivalent of His^{187} in human PrP (Fig. S1). The pH-dependent protonation of this histidine is thought to play an important role in the electrostatic network and the stability of the globular part of PrP (25, 26). However, the deletion of the other residues might also impact the thermodynamic stability of the protein. We thus tested whether the deletion affected the stability using a thermal shift assay to determine the melting temperature of WT and mutant PrP. The melting temperature of Δ190–196 PrP (49.9 °C) was reduced by 7 °C compared with the WT PrP in sodium acetate buffer (10 mM, pH 5.0) (Fig. 2*D*). A marked reduction of 8 °C was also observed in these assays, using a different condition, sodium phosphate buffer (250 mM, pH 5.1), that increases the thermal stability of both WT and Δ190–196 recombinant PrPs (Fig. S2). Altogether these observations indicate that Δ190–196 mutant PrP conserves the overall structure of WT PrP but loses some stability.

Expression of the mutant PrP^C in RK13 cells

Ovine Δ190–196 PrP was stably transfected in RK13 cells to generate sublines and clones referred to as Δ190–196 Rov. Mutant PrP was efficiently expressed as a glycoprotein in Rov cells. Western blotting showed that unglycosylated forms of Δ190–196 PrP^C were underrepresented compared with WT or Δ193–197 PrPs generated previously (23) (Fig. 3*A*). Deglycosylation

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

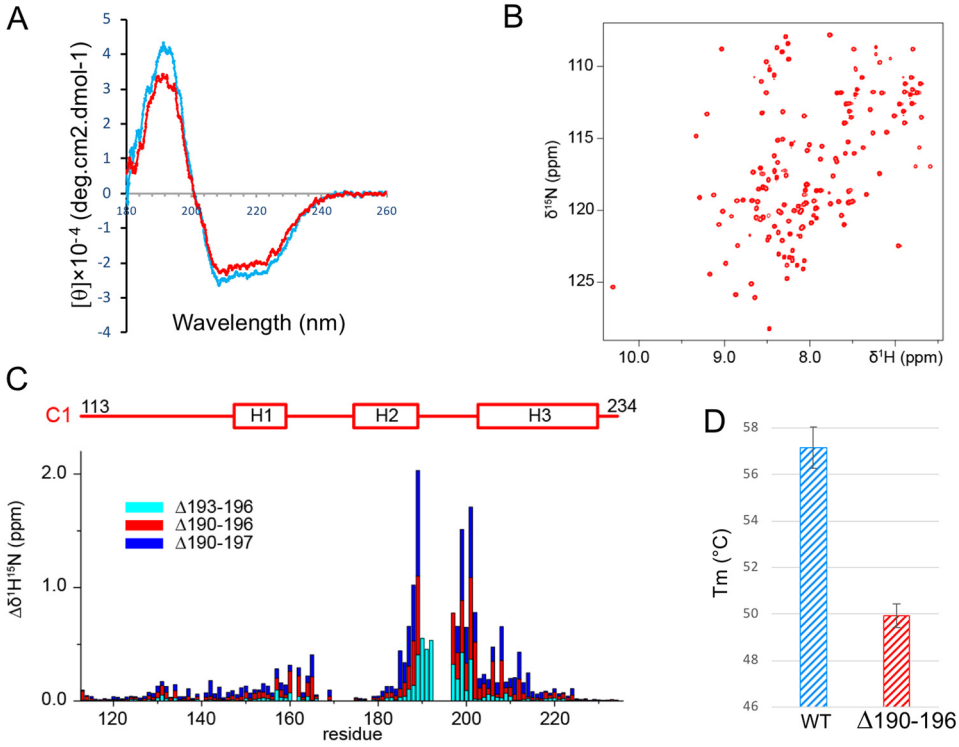

Figure 2. Structure and stability of recombinant Δ190–196 PrP. *A*, comparative analysis of the secondary structures of WT PrP (*blue*) and Δ190–196 PrP (*red*) by CD. Far UV spectra indicate that the secondary structure of full-length WT PrP is essentially maintained in the mutant protein. *B*, NMR spectroscopy analysis of the C1-like segment (positions 113–234) of Δ190–196 mutant PrP. 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of 250 μM recombinant ^{15}N^{13}C-labeled Δ190–196 $C1_{113}$, acquired at a magnetic field of 18.8 T and a temperature of 298 K. *C*, combined amide chemical perturbations (obtained with weighing factors of 1 for ^{1}H and 1/10 for ^{15}N), measured for each nonproline residue with respect to WT PrP, are represented as superimposed *bar diagrams*. Perturbations are shown for Δ190–196 $C1_{113}$ (*red*) and compared with those previously obtained for PrP Δ193–196 (*cyan*) and Δ190–197 (*blue*) (23, 24). The positions of the three α-helices, H1, H2, and H3, obtained by analysis of Δ190–196 $C1_{113}$ ^{13}Cα chemical shifts by TALOS-N (71) are shown at the *top*. *D*, comparison of stability between WT and Δ190–196 mutant PrP. Means melting temperatures (T_m) and standard deviations from five experiments were determined for full-length WT PrP (*blue*, 57.1 °C ± 0.9 °C) and Δ190–196 PrP (*red*, 49.9 °C ± 0.5 °C), for proteins resuspended in the same buffer conditions as for CD and NMR analysis (10 mM sodium acetate, pH 5).

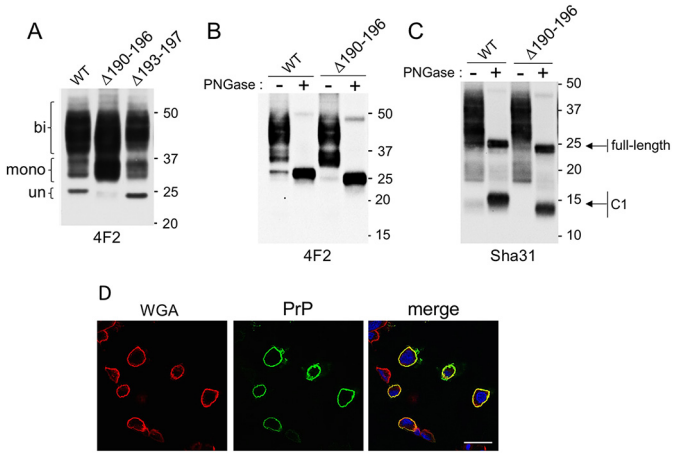

Figure 3. Expression of WT and Δ190–196 PrP^{C} in RK13 cells. *A*, comparison of the electrophoretic profile of WT PrP, Δ190–196 mutant PrP, and the previously established closely related Δ193–197 mutant (23) by immunoblotting. Molecular mass markers are indicated on the *right*. On the *left*, un-, mono-, and biglycosylated species are indicated. *B* and *C*, PNGase F treatment was used to resolve the PrP pattern as a single aglycosylated polypeptide. *D*, confocal microscopy analysis of immunostained cells showed co-localization (*merge*; in *yellow*) of Δ190–196 PrP (*green*) with WGA (*red*) at the cell surface. *Bar*, 50 μM. The 4F2 anti-PrP mAb was used in *A*, *B*, and *D*, and Sha31 mAb was used for *C*.

by PNGase F treatment corroborated the high glycosylation level of Δ190–196 PrP and indicated that the mutant protein was smaller than WT PrP^{C} by ~1 kDa, as expected (Fig. 3*B*). Using an antibody with an epitope in the C-terminal part of PrP rather than in the N-terminal region allowed us to identify both the full-length protein and its natural C-terminal C1 fragment. PNGase treatment was required for accurate identification of PrP^{C} and C1, because they are both highly glycosylated. The relative proportion of the full-length PrP *versus* the C1 fragment was roughly similar for the WT and the mutant protein (Fig. 3*C*). Immunofluorescence showed co-localization of Δ190–196 PrP with WGA, a lectin marker of plasma membrane glycoconjugates, indicating that the mutant protein was correctly addressed to the Δ190–196 Rov cell surface (Fig. 3*D*) as with the WT protein (27, 28). These observations indicate that Δ190–196 PrP has correct post-translational modifications and cell trafficking.

Spontaneous generation of a self-sustained protease-resistant form of PrP in Δ190–196 rov

The expression of Δ190–196 PrP was turned on by addition of doxycycline, and we followed the fate of the protein over cell passaging by Western blotting, checking for the appearance of PK-resistant forms. Although Δ190–196 PrP was sensitive to PK digestion during the first passages, a PK-resistant form systematically appeared, usually after the fourth or fifth passage (Fig. 4*A*). This protease-resistant form termed Δ190–196 PrP^{res} persisted for >1 year of continuous culture (Fig. 5*A*). The

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

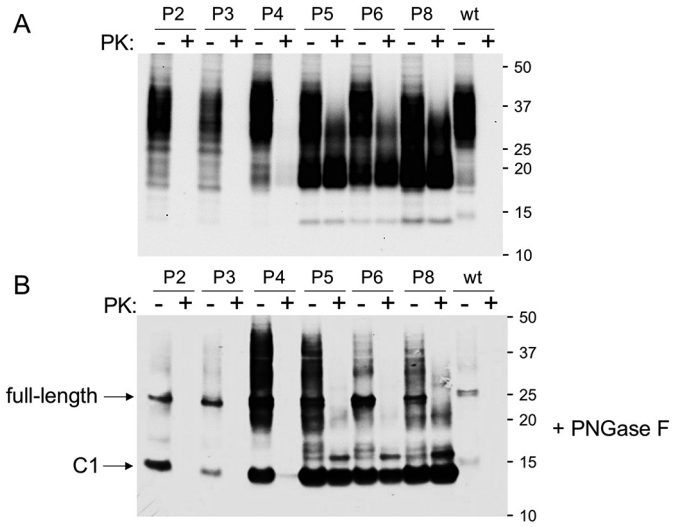

Figure 4. Spontaneous formation of PK-resistant PrP in Δ190–196 Rov cells. Immunoblots of samples from Δ190–196 Rov cell cultures over passaging, passages 2–8 (*P2–P8*), as indicated at the *top* of each panel. *A*, the equivalent of 10 μg of total protein from the cellular lysates were treated or not with PK as indicated at the *top* of lanes and were loaded on the gel. *B*, the same samples that are in the *upper blot* were treated with PNGase F before loading. Full-length mutant PrPs and the C1 fragments are indicated by *arrows*. The immunoblots were done with Sha31 mAb.

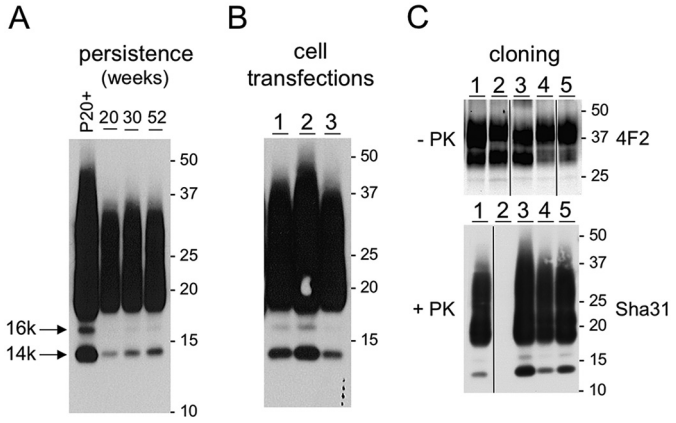

Figure 5. Persistence of the PK-resistant form in cultures, insolubility of PrP^{res}, and reproducibility of spontaneous conversion. Immunoblots of PK-treated samples are shown. *A*, Δ190–196 PrP^{Sc} was produced persistently up to 1 year of continuous cell culture passage (1 per week). PrP^{res} at 20, 30, and 52 weeks of culture are shown: 10 μg of total protein in 10 μl of cell lysate were digested and loaded (*lanes 2–4*). In *lane 1* (P20+), the equivalent of 100 μg of protein from the passage at 20 weeks was loaded after PK digestion and concentration of insoluble material at 22,000 × *g*, to improve detection of the 14- and 16-kDa unglycosylated bands (Sha31 mAb). *B*, spontaneous emergence of Δ190–196 PrP^{res} in three populations of Δ190–196 Rov cells obtained from independent transfections (*lanes 1–3*). *C*, individual clones isolated from two independent transfections. Five clones (*lanes 1–5*) with roughly similar Δ190–196 PrP expression levels (*upper panel*, 4F2 mAb) are shown. They produced spontaneously the PK-resistant form after eight passages of culture (*lanes 1*, *3*, *4*, and *5*) with the exception of clone 12 (*lane 2*) (*lower panel*, Sha31 mAb).

electrophoretic profile of Δ190–196 PrP^{res} was characterized by a large smear of glycosylated species and the presence of a well-individualized faint band migrating at 14 kDa (Fig. 4*A*). A second weaker band migrating at 15.5–16 kDa was detected upon overexposure of the blots or when enough material was loaded on the gel (Fig. 5*A*). Treatment with PNGase F allowed resolving the whole emerging PK-resistant species in two major bands: a main 14-kDa species that had the same size than the C1 fragment and a larger less represented peptide above the 15-kDa molecular mass marker that will be further referred to as 16-kDa PrP^{res} (Fig. 4*B*). This indicated that the 14- and 16-kDa bands identified without PNGase treatment (Figs. 4*A* and 5*A*) were nonglycosylated native forms of Δ190–196 PrP^{res}.

The spontaneous emergence of PK-resistant Δ190–196 PrP was reproducible and occurred systematically from bulk cultures of Δ190–196 Rov obtained from three independent transfections (Fig. 5*B*). Individual Δ190–196 Rov clones obtained by limiting dilution spontaneously produced Δ190–196 PrP^{res}, except for one clone, clone 12, despite expression of the mutant PrP to levels similar to those of other clones (Fig. 5*C*). This "resistant" clone was useful for the infection studies described in the following section, and its existence suggested that currently unrecognized cellular factors are key for the spontaneous generation of Δ190–196 PrP^{res}. Δ190–196 Rov cells could be frozen and thawed, without affecting the generation of PK-resistant PrP species. This characteristic together with persistence in cell culture recalled that of prion-infected cells.

We next examined whether the biochemical properties of Δ190–196 PrP^{Sc} resembled those of prions passaged in WT Rov cells. Δ190–196 Rov lysates were treated with increasing PK concentrations and analyzed by Western blotting. Δ190–196 PrP^{Sc} resisted to higher concentration of PK (Fig. 6, *A* and *B*) than 127S prions propagated in WT Rov (Fig. 6*C*). Δ190–196 PrP^{res} was recovered by centrifugation at 20,000 × *g* after PK digestion, indicating that it was insoluble and aggregated (Fig. 5*A*). The aggregation size of Δ190–196 PrP^{Sc} was determined by sedimentation velocity. Δ190–196 PrP^{Sc} formed assemblies with a size in the range of PrP^{Sc} assemblies formed by subfibrillar prions (Fig. 6*D*) according to previous reports (29, 30). 127S PrP^{Sc} assemblies from Rov cells had slightly larger assemblies with respect to size (Fig. 6*D*). Whether the difference is due to the number of PrP-mers composing the assemblies or to the density of their main core remains to be determined.

To summarize, introduction of the 190–196 deletion in RK13 cells favored the spontaneous and persistent production of PK-resistant PrP^{Sc} species with an atypical electrophoretic pattern. Δ190–196 PrP spontaneously adopted a conformation that showed hallmarks of a prion: insolubility, aggregation, protease resistance and cell perpetuation. We thus called this entity Δ^{Spont} prion.

Δ^{Spont} prion is infectious for cells expressing homologous or closely related mutant PrP

The infectious potential of Δ^{Spont} prions was primarily tested by cell assay using Δ190–196 or WT Rov. As control, these cells were infected by 127S prions propagated in WT Rov. Naïve Δ190–196 Rov were susceptible to Δ190–196 lysates containing Δ^{Spont} because they produced PrP^{res} in large amounts as soon as the second passage postinfection (Fig. 7), whereas mock-infected cells did not. In contrast, WT Rov were not infectable with Δ^{Spont} prions (Fig. 7). Conversely, 127S could propagate in WT Rov but not in Δ190–196 Rov, at least for the first passages,

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

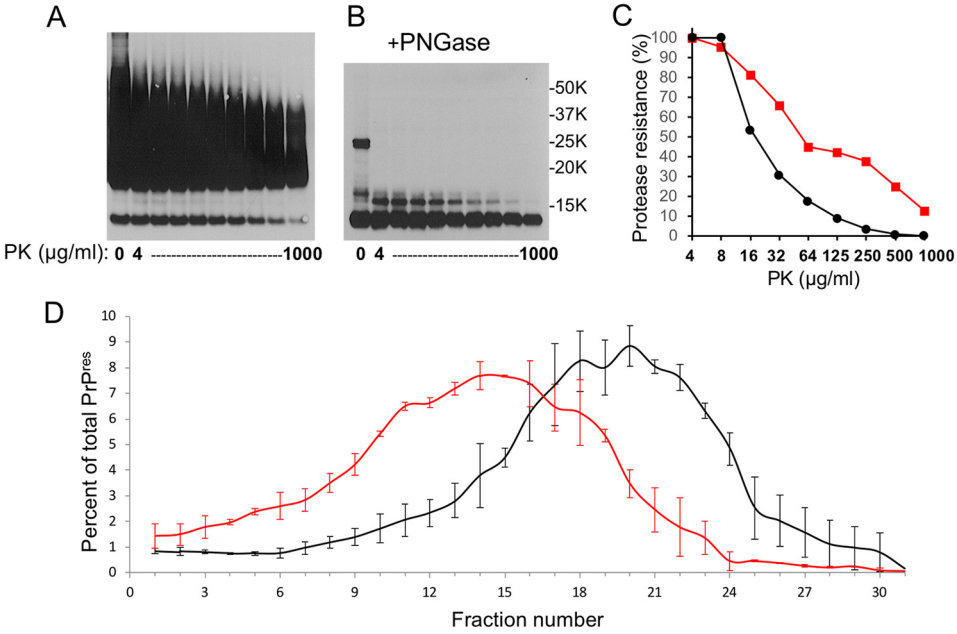

Figure 6. PK resistance and aggregation state of Δ190–196 PrP^{res}. *A*, Δ190–196 PrP^{res} resists to high concentrations of PK. 10 µg of total protein were treated with 2-fold increasing concentrations of PK up to 1 mg/ml. *B*, samples obtained in *A* were treated with PNGase F to visualize and determine the molecular mass of polypeptides after PK treatment. *C*, comparative PK resistance of Δ190–196 PrP^{Sc} (*red squares*) and 127S PrP^{Sc} (*black circles*). *D*, sedimentation velocity profile of Δ190–196 PrP^{Sc} (*red line*) and 127S PrP^{Sc} (*black line*). Fraction number 1 corresponds to the top of the gradient. The results are the means ± S. D. of three independent experiments. In *C* and *D*, both proteins were extracted from uninfected Δ190–196 Rov cells and 127S-infected Rov cells, respectively.

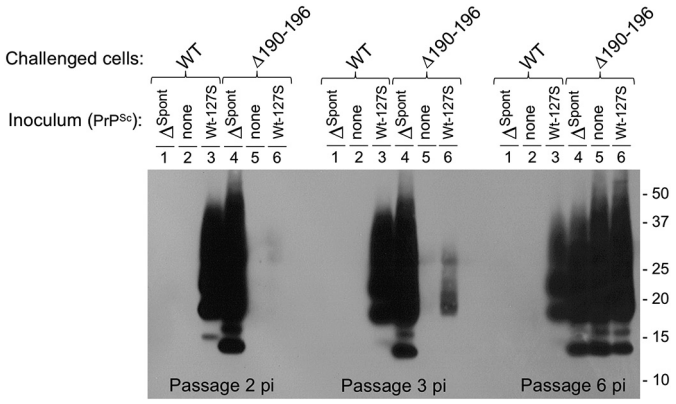

Figure 7. Infectious potential of Δ^{Spont} prions. Rov cells expressing either WT PrP or Δ190–196 PrP were challenged with cell homogenates from Δ190–196 Rov cells (Δ^{Spont} inoculum), 127S-infected WT Rov cells (WT-127S), or noninfected RK13 cells (none). The cells were analyzed for the presence of PK-resistant PrP from passages 2–6 postinfection, as indicated. Western blotting was done with Sha31 mAb.

the spontaneous emergence of Δ^{Spont} prions on long-term passage obscuring the fate of 127S infection.

We next challenged the resistant Δ190–196 cell clone 12 and found it readily susceptible to Δ^{Spont} prion infection. PrP^{res} was detected as soon as the second passage and up to passage 8 postinfection (Fig. 8*A*). Δ^{Spont} prions were thus *de novo* infectious for cells expressing the homologous mutant protein. The atypical profile of PrP^{res}, with the characteristic presence of 14- and 16-kDa bands, was faithfully conserved upon infection.

Previously, we established a set of Rov cells expressing PrP with deletions of different sizes in the C terminus of helix H2. None of these cells produced spontaneously PK-resistant forms of mutant PrP (23). In particular, the Δ193–197 and Δ192–197 cells were susceptible to several ovine prions, including 127S. In contrast, the Δ190–197 cells were resistant to all of them (23). These three mutant cell lines were challenged with Δ^{spont} prions to determine whether Δ^{Spont} prion replication was strictly dependent on Δ190–196 PrP. Cells expressing PrP with 190–197, 192–197, or 193–197 deletions were all susceptible to Δ^{Spont} infection (Fig. 8*A*). The Δ^{Spont} PrP^{res} pattern was mostly maintained in the infected cells.

We knew from our previous work that 127S prions propagated on Δ193–197 Rov cells were still infectious for WT Rov cells, indicating a structural compatibility between this mutant and WT PrP for 127S prion conversion. It was thus appealing to determine whether Δ^{Spont} propagated on Δ193–197 Rov cells could similarly become infectious for WT cells. The results showed that this was not the case, although ΔSpont prions propagated on Δ193–197 Rov cells were *de novo* infectious for naïve Δ193–197 cells (Fig. 8*B*). Similar results were obtained for Δ^{Spont} propagated on Δ192–197 Rov cells: it was *de novo* infectious for Δ192–197 Rov cells and infectious for Δ193–197 Rov cells but not for WT Rov cells (Fig. 8*C*).

Altogether, these cell assays demonstrate the infectivity of Δ^{Spont} prions and their ability to propagate on cells expressing homologous Δ190–196 PrP or closely related mutants but not WT PrP. This suggests that a certain degree of compatibility in the H2 C-terminal sequence of PrP is required for conversion by Δ^{Spont} prions.

Molecular typing of Δ^{spont} prions

Most prion strains can be grouped into two broad categories with respect to their molecular pattern, depending on the N-terminal end point of the C2 PrP^{res} fragment. Type 1 strains produce PrP^{res} species starting around position 85 of ovine PrP, whereas type 2 strains PrP^{res} species are shorter, beginning at

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

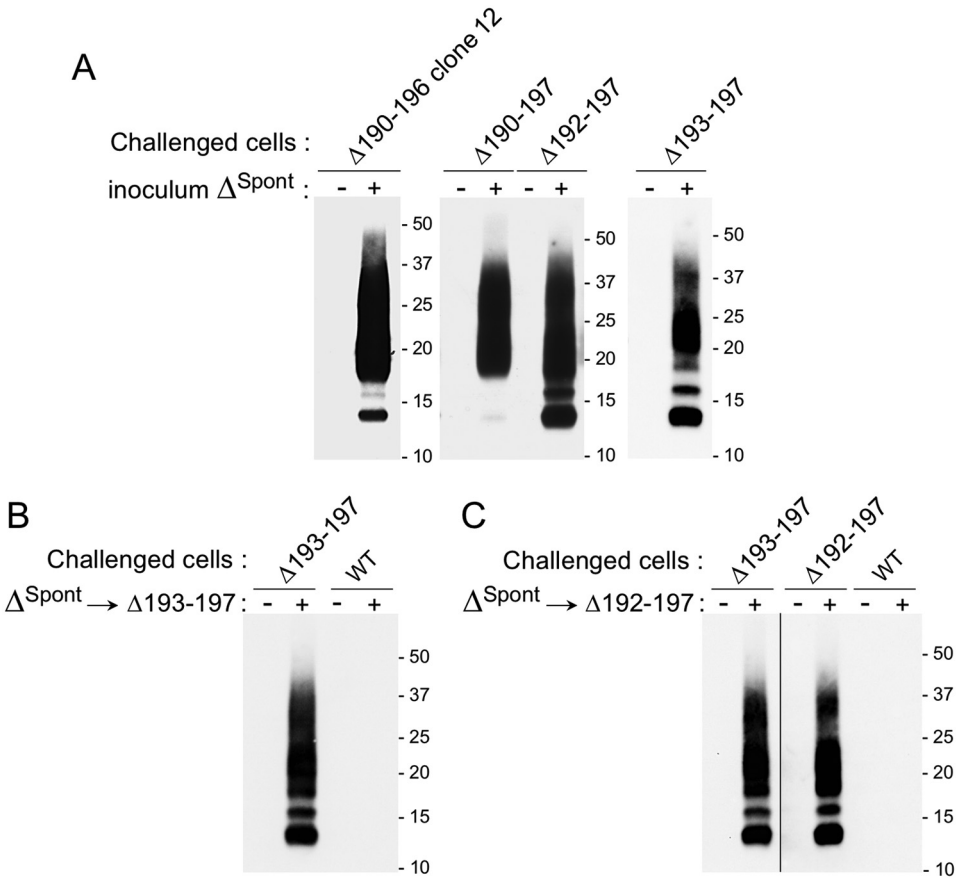

Figure 8. Conversion of homologous PrP or closely related mutant PrPs by Δ^{Spont} prions. *A*, Δ190–196 Rov clone 12 that did not produce spontaneously Δ^{Spont} PrP^{res} was infected by Δ^{Spont} prions (*left panel*). Rov cells expressing other closely related deletion mutants were also susceptible to the infection by Δ^{Spont} prions (*middle* and *right panels*). Immunoblots show PK-treated samples, eight passages postinfection. *B* and *C*, cell homogenates of Δ193–197 (*B*) or Δ192–197 (*C*) Rov cells inoculated with Δ^{Spont} prions (eighth passage, $\Delta^{Spont} \rightarrow$ Δ193–197 and $\Delta^{Spont} \rightarrow$ Δ192–197) were used as inocula to infect Rov cells expressing homologous PrP, WT PrP, or the other mutant. The analysis of PK-treated samples harvested after eight passages postinfection is shown.

position 100. The size of unglycosylated C2 PrP^{res} is thus a generic way to discriminate between strains. Therefore, we compared the electrophoretic profile of Δ^{Spont} PrP^{res} with 127S type 1 prion strain propagated on WT Rov cells and with type 1 ($T1^{Ov}$) and type 2 ($T2^{Ov}$) strains propagated on Δ193–196 Rov cells, which express a mutant PrP with a size closer to Δ190–196 PrP (Fig. 9). Based on the aglycosylated lower bands, we could ascertain that the main 14-kDa band of Δ^{spont} prion was shorter than any type 1 or type 2 C2 fragment and that the 16-kDa PK-resistant band was just slightly shorter than the C2 fragment of the type 2 strain. The PrP^{res} electrophoretic profile of Δ^{spont} prions was thus clearly atypical with simultaneous presence of two major bands shorter than the usual PK-resistant C2 fragment from "classical" prion strains.

To characterize in more detail the nature of the 14- and 16-kDa fragments from Δ^{Spont} PrP^{res}, we performed an epitope mapping with anti-PrP antibodies spanning the entire PrP C terminus, after deglycosylation of PrP^{res} species. Signals produced by Sha31 and 8F9 mAbs were similar, indicating that Δ^{Spont} PrP^{res} species are C-terminal fragments of PrP (Fig. 10).

Regarding the major 14-kDa species, the band was not detected by 12B2 and 8G8 mAbs. Part of the 14-kDa band of higher molecular mass was recognized by 6C2 mAb and thus contained the full epitope of this antibody (^{114}HVAAAGA).

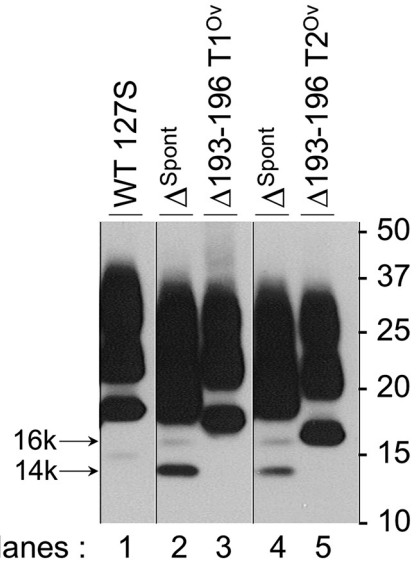

Figure 9. Molecular typing of Δ^{Spont} PrP^{res}. The electrophoretic profiles of prions propagated on Rov cells were compared. The profile of Δ^{Spont} PrP^{res} (*lanes 2* and *4*) with its 14- and 16-kDa bands, as indicated by *arrows*, was different from those of type 1 strains (127S and $T1^{ov}$, *lanes 1* and *3*, respectively) and type 2 strain ($T2^{Ov}$, *lane 5*) propagated in WT Rov (*lane 1*) or in Δ193–196 Rov cells (*lanes 3* and *5*).

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

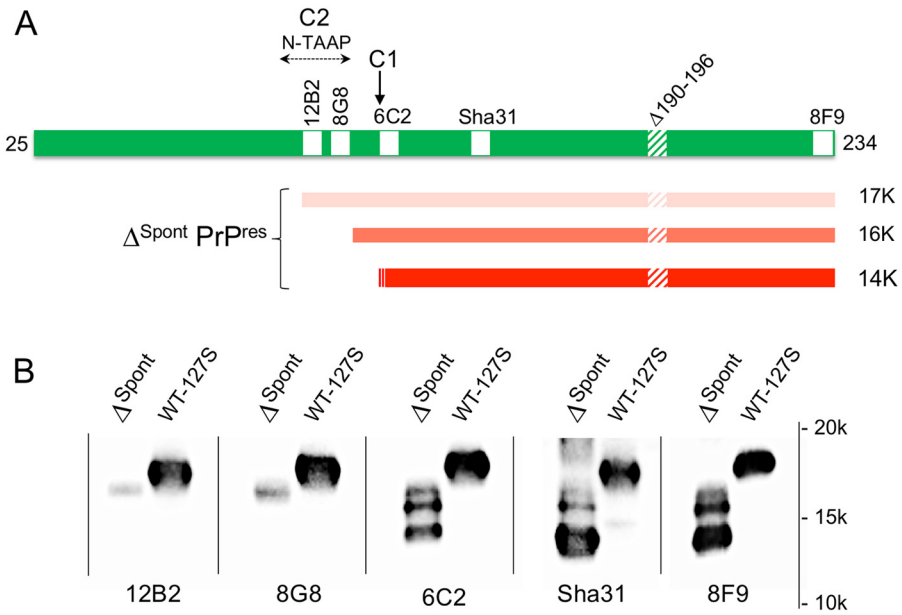

Figure 10. Epitope mapping of Δ^{Spont} PrP^{res}. *A*, scheme representing mature ovine PrP (positions 25–234, in *green*) with name and position of mAbs epitopes (*open square*). The α cleavage site generating C1 fragment is indicated by an *arrow*. The area covering N-terminal amino acid profile (N-TAAP) variations of C2 PrP^{res} fragments among prion strains (73) is indicated by the *horizontal double-headed dotted arrow*. PrP^{res} fragments resulting from PK digestion of Δ^{Spont} prions are represented *below* the scheme, the 14-kDa C1-like PrP^{res} is in *red*, the 16-kDa is in *orange*, and the faint 17-kDa C2-like species is in *pink*. *B*, representative Western blots of PNGase F-treated Δ^{Spont} PrP^{res} and WT PrP^{res} revealed with the different anti-PrP mAbs. For the comparative analysis, the same couple of PrP^{res} samples was loaded several times on a same gel, separated by stained molecular mass markers, and then transferred on a membrane that was split into six parts, each being incubated with a different primary antibody, as indicated.

The other part of lower molecular mass was 6C2-negative, indicating the loss of at least His^{114} (Figs. 10 and Fig. S3). Therefore the 14-kDa band contained PrP^{res} polypeptides with different N-terminal endpoints at the vicinity of the main cleavage site reported for the C1 fragment (8, 31). In noninfected WT Rov cells and in Δ^{Spont}-free Δ190–196 Rov cells (early passage), part of the C1-PrP^{C} fragment is 6C2-positive (Fig. S3), suggesting a certain variability in N-terminal endpoints. The PK-resistant 14-kDa band from Δ^{Spont} PrP^{res} could thus result from protease digestion of the misfolded full-length Δ190–196 PrP, from a conformational change of the C1 fragment, or from both.

Regarding the 16-kDa band, the epitope mapping indicated a recognition by the 6C2 but not the 8G8 mAb. Therefore the N terminus of these truncated PrP^{res} polypeptides starts between residues inside the 8G8 epitope (positions 100–105) and residue 113 at the head of 6C2 epitope, most likely close to the 8G8 border based on the molecular mass of these fragments. A faint and fuzzy band was also observed just above the 16-kDa band with all the mAbs used. This indicated the presence of few Δ^{Spont} PrP^{res} species of larger size close to the C2 fragments from conventional prions.

Altogether these observations show that Δ190–196 PrP turned spontaneously into a misfolded form producing a complex pattern of PK-resistant species with a main core of ~14 kDa. These PrP^{res} fragments of different size reflect the formation of different structures or assemblies by the misfolded protein. The prominence of the 14-kDa band raises the question of whether it could correspond to the minimum and necessary portion of Δ190–196 PrP for Δ^{Spont} replication as does the C2 fragment for classical prions. As a corollary, this opens the unorthodox question of whether the mutant C1 fragment itself could misfold, either spontaneously or after conversion by Δ190–196 PrP^{Sc} species produced from the full-length mutant PrP.

Conversion of mutant C1 by Δ^{spont} prions

To examine the possibility that mutant Δ190–196 C1 PrP^{C} (ΔC1) alone can misfold into PrP^{Sc}, either spontaneously or following infection by Δ^{Spont} prions, we generated Rov cells expressing solely Δ190–196 C1 PrP^{C}. The C1 fragment is generated by PrP^{C} cleavage at the α cleavage site, right upstream the N-terminal hydrophobic region. In human brain, the main C1 fragment can start at His^{111} and was referred as to C1-upper, but it can also start at Met^{112} and was referred to as C1-lower (8). Varying degrees of proteolytically processed C1 fragments at equivalent positions were suggested for ovine PrP (31). We thus built two constructs to express the C1 part of ovine PrP flanked by the N- and C-terminal signal peptides of ovine PrP. The WT and Δ190–196 $C1_{113}$ constructs were designed to start at residues Lys^{113}, one residue upstream from His^{114}, the equivalent of His^{111} in human PrP, to warrant both a correct and efficient cleavage of the N-terminal peptide signal and the presence of the full 6C2 epitope. The constructs referred as $C1_{115}$ were designed to start at Val^{115} to produce an equivalent to the C1-lower fragment.

As with WT and Δ190–196 full-length PrP^{C}, the C1 fragments were highly glycosylated in RK13 cells (Fig. 11*A*), but the unglycosylated forms were expressed in lower proportion in the two Δ190–196 mutants than in the WT counterparts. The C1 proteins had the expected size (Fig. 11*B*) and were present at the cell surface (Fig. 11, *C* and *D*), indicating that signal peptides were functional and processed by the cells.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

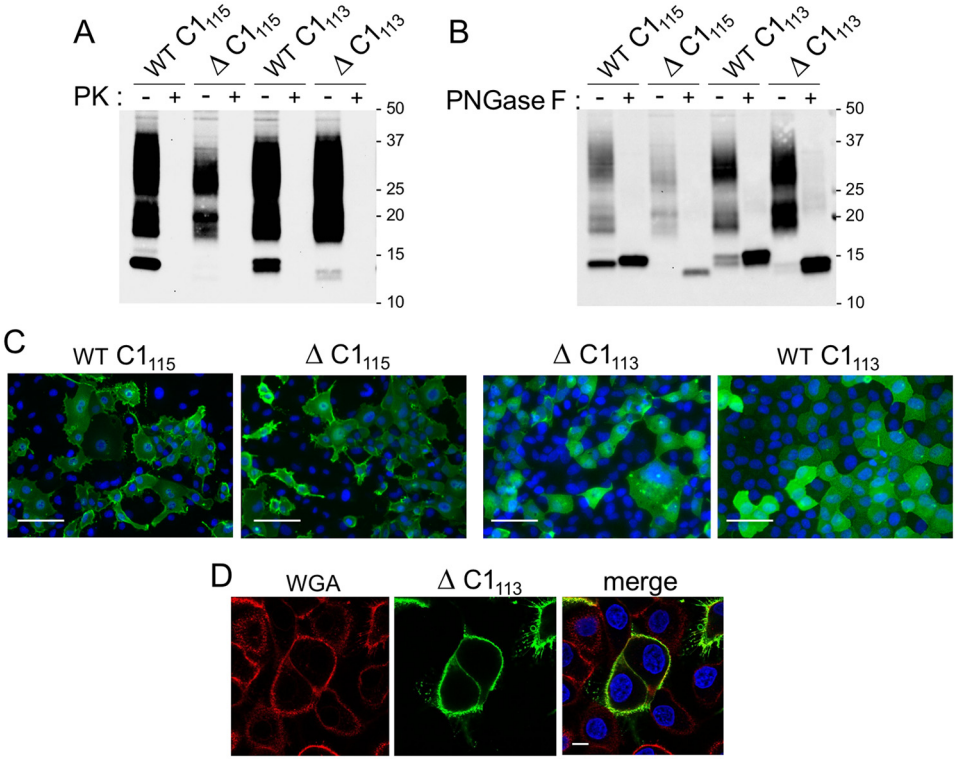

Figure 11. Expression of WT and Δ190–196 C1 polypeptides in RK13 cells. *A*, immunoblot analysis of stably transfected C1 constructs, before or after PK treatment. The expression of C1-like polypeptides (residues 113–234 and 115–234 of ovine PrP; $C1_{113}$ and $C1_{115}$, respectively) and equivalent fragments with the HTVTTTT Δ190–196 deletion ($\Delta C1_{113}$ and $\Delta C1_{115}$) was analyzed. *B*, immunoblot analysis of the same C1 constructs before and after PNGase F treatment. 25 μg of cellular protein was loaded. *C*, C1 PrP^C expression pattern by immunofluorescence. PrP^C (*green*) and nuclear marker DAPI (*blue*) staining of nonpermeabilized fixed cells. *Scale bars*, 50 μm. *D*, confocal microscopy imaging of $\Delta C1_{113}$ Rov cells co-stained for WGA (*red*) and PrP (*green*). The nuclei are stained with DAPI (*blue*). Merged confocal images or individual channels are shown. *Scale bar*, 10 μm.

In contrast to full-length Δ190–196 PrP^C, mutant C1 PrP^C did not spontaneously convert into a PK-resistant form over passages, even after several months of cell culture (Fig. 12). However, upon exposure to Δ^{Spont} prions, these forms were converted into self-replicating PK-resistant PrP^{Sc} (Fig. 12). These PrP^{Sc} species were termed $\Delta C1^{Sc}$. C1 conversion process was specific to Δ^{Spont} prions and needed the Δ190–196 deletion. 127S prions were not able to convert WT or Δ190–196 C1 PrP^C. Δ^{Spont} prions were unable to convert WT C1 (Fig. 12), as it was previously unable to do for full-length WT PrP (Fig. 7). As with WT PrP, a certain degree of sequence compatibility between the cellular substrate and the infecting prion is required for C1 conversion by Δ^{Spont} prion.

$\Delta C1^{Sc}$ are de novo infectious and preserve Δ^{spont} PrP^{res} signature

We finally investigated the infectious potential of $\Delta C1_{113}{}^{Sc}$ and $\Delta C1_{115}{}^{Sc}$. We used, as inocula, cell lysates of Δ^{Spont}-infected Δ190–196 C1 at passage 8 (see above). Controls were made to exclude any remnant infectivity of Δ^{Spont} prions or spontaneous infectivity of the homogenates from cells expressing mutant C1 PrP^C. As shown in Fig. 13, both $\Delta C1_{113}{}^{Sc}$ and $\Delta C1_{115}{}^{Sc}$ were *de novo* infectious for cells producing the homologous mutant ΔC1 proteins. In contrast cells expressing their WT counterparts were not susceptible to the infection. Remarkably, $\Delta C1^{Sc}$ exhibited the same activity as Δ190–196 PrP^{Sc} with respect to the panel of susceptible cells. PrP^C from resistant Δ190–196 clone 12 and from the two closely related mutants Δ193–197 and Δ192–197 were converted into PK-resistant PrP^{Sc}. The Western blotting signature of PrP^{res} in these cells recalled that produced following Δ^{Spont} prion infection (compare Figs. 13 and 8*A*). Not only the characteristic 14-kDa band, but also the 16-kDa band was present, indicating additional conversion of the full-length proteins by $\Delta C1^{Sc}$. The main strain-specific determinant of Δ^{Spont} prions was thus enciphered in $\Delta C1_{113}{}^{Sc}$ or $\Delta C1_{115}{}^{Sc}$.

Discussion

This work focuses on the spontaneous, in-cell conversion of a deletion mutant PrP into a novel form of prion. Δ^{Spont} prions showed three main original features: an internal deletion of seven residues in the protease-resistant core, an unusual PrP^{res} signature, and a remarkable capacity to propagate on the homologous C-terminal C1 segment of PrP, thus generating mutant C1 prions. In addition, this work provides a unique cell model to get insights in cell processes and factors associated with spontaneous prion emergence.

Spontaneous misfolding of ovine PrP with deletion in α-helix H2

Although spontaneous conversion of PrP into prion is a rare event, modifications in PrP can considerably increase this occurrence because not less than ~40 disease-causing mutations are identified in inherited cases of human PrP (16).

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

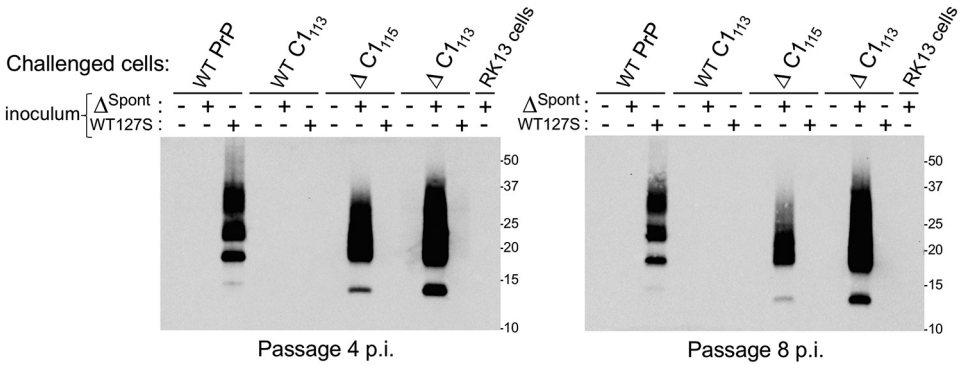

Figure 12. Infection of WT C1 and ΔC1 Rov cells by 127S or Δ^{Spont} prions. Immunoblots of PK-treated samples at passage 4 (*left panel*) or passage 8 (*right panel*) postinfections are shown. Sha31 mAb defines both $C1_{113}$ and $C1_{115}$.

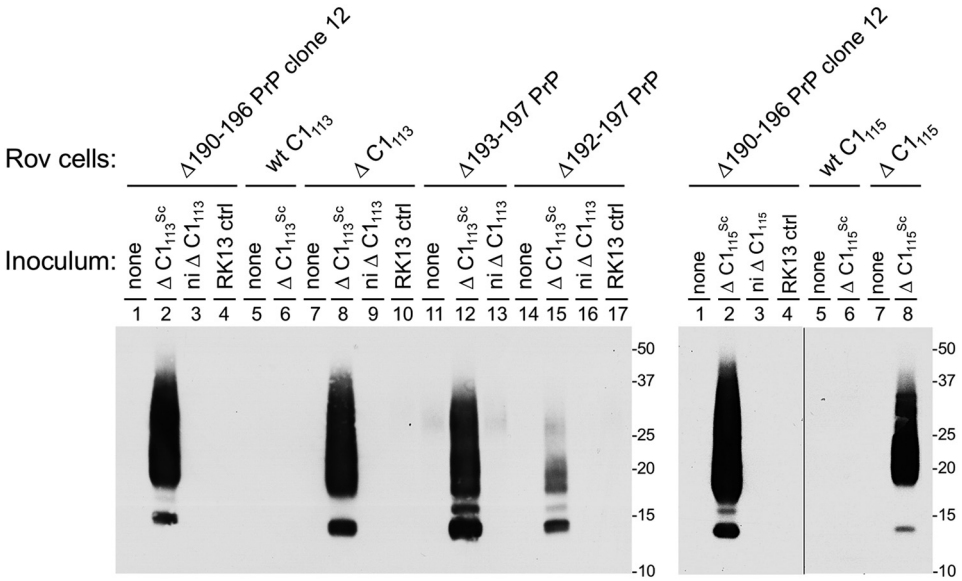

Figure 13. Infectivity of $\Delta C1^{Sc}$ prions. Rov cells expressing different forms of mutated, full-length PrP and WT/mutated C1 PrP were left uninfected (*none*) or exposed to $\Delta C1^{Sc}$ (*left panel*, $\Delta C1_{113}^{Sc}$; *right panel*, $\Delta C1_{115}^{Sc}$) obtained from cell homogenates at passage 8 (see Fig. 11). As controls, noninfected (*ni*) cells and Δ^{Spont}-infected RK13 cells (control, *ctrl*) were used. The challenged cells were Δ190–196 Rov cell clone 12 that did not produce spontaneously Δ^{Spont} prions, Rov cells expressing closely related full-length deletion mutants (Δ193–197, Δ192–196), or populations of cells expressing either WT or a Δ version of $C1_{113}$ ($\Delta C1_{113}$) and of $C1_{115}$ ($\Delta C1_{115}$). Immunoblots of PK-treated cell lysates at passage 8 postinfection are shown (Sha31 mAb).

Spontaneous prion conversion also occurred in transgenic mice expressing some of these mutations (17–19, 32, 33). Conversion of equivalent mutant PrP in cell culture has so far been disappointing, maybe in part because there is still no easy cell model for efficient human prion replication. We thus considered another approach that was to use a well-characterized reverse genetic model of prion replication and to remove from PrP highly conserved residues that might be important for PrP stability while minimally affecting the overall structure. We previously identified the C-terminal region of the H2 α-helix as an area that meets these prerequisites. We found that the four contiguous threonine residues at the end of the helix were not necessary for replication of several ovine prion strains in RK13 cells (23). Deletion of the threonine cluster (Δ193–196) even favored the replication of strains difficult to propagate in cells expressing WT ovine PrP (23). Thus, we considered this deletion as a good starting point to facilitate the emergence and propagation of a spontaneous prion. Because Δ193–196 deletion was insufficient to cause spontaneous conversion of mutant PrP, we extended it to the three upstream residues His^{190}, Thr^{191}, and Val^{192}. Similar residues in human PrP are associated with disease-causing mutations H187R, T188K, and V189I responsible for either GSS or CJD (34–37), highlighting their potential importance for preservation of the normal form of the protein. We found that the simultaneous deletion of residues HTVTTTT maintained the overall PrP structure but strongly reduced the stability of the recombinant ovine PrP. Reduced stability is expected to facilitate partial or complete unfolding of the protein and its spontaneous misfolding (38). Thus the Δ190–196 deletion might have introduced perturbations in the charge equilibrium, salt bridges, and/or hydrophobic interactions. His^{187} in human PrP, equivalent to His^{190} in ovine PrP, is thought to be a key residue of the electrostatic network stabilizing the globular helical domain of PrP (26, 39). Protonation of histidine is pH-dependent, and the positive charge acquired at acidic pH is thought to be involved in the conformational shift of recombinant PrP *in vitro* (25, 40, 41). The disease-

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

causing mutation H187R is one of the rare human mutations that markedly reduces PrP stability, and this is attributed to replacement of histidine by a permanently positively charged residue (42). The deletion Δ190–196 not only removed His^{190} residue but also brought Lys-197 in position 190, mimicking the replacement of His^{190} by another permanently positively charged residue, recalling H187R mutation. This might have contributed to destabilization of Δ190–196 PrP and likely explains why the deletion Δ190–197, which eliminates the lysine residue, did not lead to spontaneous prion generation, whereas the mutant protein remained convertible into PrP^{res} by Δ^{Spont} prions. In addition, replacement of each or all the four contiguous threonines (at positions 193–196) by different residues had also affected PrP stability (43, 44). Any of these perturbations alone or in combination may have contributed to the spontaneous conversion of Δ190–196 PrP into Δ^{Spont} prions. The conservation of HTVTTTT sequence in mammalian PrPs might well reflect preservation of an important region for the dynamics and the maintenance of the helical folding of the protein in a cellular context.

Transmissibility of Δ^{spont} prions

Δ190–196 PrP was sensitive to protease digestion. However, after several cell passages, a PK-resistant form systematically emerged, indicating spontaneous conformational change of the mutant PrP. The spontaneous formation of PK-resistant PrP was verified in one occasion by an experiment of cell transfection and culture entirely carried out in prion free laboratory, excluding inadvertent contamination. The Δ190–196, or the Δ^{Spont} PrP^{Sc} entity as we called it, was shown to be a self-propagating, protease-resistant, insoluble, and aggregated form that was transmissible to other cells. Δ^{Spont} thus showed all the usual hallmarks of prion replication in cell culture. A basic characteristic of prions is their ability to transmit their own conformational state to homologous PrP^{C} and in some instance to heterologous PrP^{C}. Persistence of Δ190–196 PrP^{Sc} in cell culture indicated some replication, but as we faced a spontaneous conversion that might be reiterated at each passage, we demonstrated *de novo* infectivity of ΔSpont prion in several cell assays: (i) earlier accumulation of Δ190–196 PrP^{Sc} in exposed cells; (ii) infection of the Δ190–196 Rov clone 12 that did not produce spontaneously a PK-resistant form of the mutant protein; (iii) infection of Rov cells expressing the Δ190–196 C1 PrP^{C}; and (iv) infection of Rov cells expressing three other mutant PrPs with close deletions in the H2 C terminus, notably the Δ190–197 mutant that was refractory to infection by conventional ovine prion strains (23). Sequence proximity and/or structural adaptability between Δ^{Spont} and Δ190–197 PrP might explain it. In contrast, conversion of WT PrP by Δ^{Spont} prions failed despite many attempts and the use of different cell populations including the historic Rov clone 9 (27) or more susceptible clones (45). In a previous work, we found that the 127S ovine prion strain propagated on WT PrP was easily propagated on Δ193–197 Rov cells and reciprocally (23), suggesting a good structural compatibility for conversion between the Δ193–197 mutant and WT PrP where this strain is concerned. Here, Δ^{Spont} prion propagated on Δ193–197 PrP was still not able to convert WT PrP, indicating that the Δ193–197 PrP^{Sc} structure transmitted by Δ^{Spont} prion rather than only the sequence of the mutant protein causes the transmission barrier.

Biochemical specificities of Δ^{spont} PrP^{Sc}

The PrP^{res} pattern of Δ^{Spont} was faithfully maintained in the different cell assays. The pattern was complex and showed differentially represented bands corresponding to N-terminal truncations at different end points. It did not fit with any known prion strains regarding the 14- and 16-kDa bands. The minor 16-kDa band was slightly more N-terminally truncated than the classic C2 fragment from type 2 prions. The major 14-kDa band had a size close or similar to that of the C1 fragment of Δ190–196 PrP. These two bands were found in individual clones of Δ190–196 Rov cells with unsimilar relative proportion as in populations of transfected cells. A third, minor, 8G8/12B2-positive band was identified that might be close or similar to that of more classical type1 prions. Thus Δ^{Spont} PrP^{res} included fragments close to C2 of type 1 and type 2 plus prominent C1-like species. C2-like protease-resistant fragments are most probably truncated forms of full-length mutant Δ190–196 PrP^{Sc}, whereas C1-like PrP^{res} species might result from conversion of the full-length mutant PrP, its C1 fragment, or both. The unconventional PrP^{res} profile of Δ^{Spont} prion strongly suggests an original structural organization but might be complicated by conversion of two substrates, the full-length protein and its C1 fragment, rather than only full-length PrP for more classical prions.

Generation of Δ190–196 C1 prion

PrP^{C} is naturally cleaved into a C-terminal C1 fragment and its complementary N-terminal N1 at the α cleavage site. This cleavage, the efficacy of which is cell-dependent, was attributed to metalloproteases of the ADAM family, but the exact nature of the enzyme remains a subject of controversy and may depend on tissues or cell lines considered (46–50). Moreover, the cleavage is not dependent on a specific sequence, and whether it occurs at the cell surface or inside the cell between the Golgi and the plasma membrane is not clearly established (51, 52). In Rov cells, the C1 fragment appears as a relatively large N-terminally truncated band, beginning around position His^{114} or Val^{115} equivalent to that determined in human brain (8, 31). The consensus is that the C1 fragment of PrP^{C} is shorter than the PrP^{res} domain and thus cannot be converted into prion. Furthermore, an apparent inverse correlation between C1 levels and cell susceptibility to prions was reported in cell lines, as well as a dominant-negative effect on prion replication in transgenic mice overexpressing C1 (14, 53). Thus, the C1 fragment is often considered as a competitive inhibitor of PrP^{C} conversion. We found here different outcomes. The main PrP^{res} domain of Δ^{Spont} prions had a size close or similar to that of C1, and Δ^{Spont} prions were able to convert the mutant form of C1. Protease-resistant $\Delta C1^{Sc}$ showed hallmarks of prion replication in cell culture and was transmissible *de novo* to cells expressing the homologous C1 protein, the homologous full-length mutant PrP, or closely related mutants. To the best of our knowledge, there is no other report of confirmed

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

conversion of C1 or C1-like polypeptides. Two presumptive bovine spongiform encephalopathy cases with C1-like PrP^{res} signature were reported, but they were finally found to lack prion infectivity after inoculation of brain material to cattle and to bovine PrP transgenic mice (54, 55). The exceptional conversion of ΔC1 into prion after infection by the unconventional Δ^{Spont} prion is likely due to the conjunction of the sequence modification introduced in the polypeptide and adoption of a misfolded structure significantly different from that of the other prions.

$\Delta C1^{Sc}$ as a driving force for the propagation of the Δ^{spont} prion

ΔC1 prions had templating activity on the full-length mutant proteins and preserved the PrP^{res} signature of Δ^{Spont} prion. Indeed, infection by ΔC1 prions produced not only C1-like PrP^{res} but also C2-like 16-kDa species that were larger than C1 and thus resulted from conversion of the full-length protein. $\Delta C1^{Sc}$ therefore behaves like a prion strain that maintains the structural information associated with the specific biochemical profile of Δ^{Spont} prion. This strongly suggests that the 14-kDa ΔC1-like PrP^{res} core produced by spontaneous conversion of Δ190–196 PrP has at least contributed to Δ^{Spont} prion propagation and might even be the most important template for the normally folded mutant protein.

Because ΔC1 did not spontaneously form a prion, the primary event in Δ^{Spont} prion formation may be the spontaneous conversion of full-length PrP. Then the reciprocal capacity of Δ190–196 PrP^{Sc} to induce conversion of ΔC1 fragment and of $\Delta C1^{Sc}$ to induce full-length mutant PrP conversion would lead to Δ^{Spont} complex pattern.

It was unexpected that the short $\Delta C1_{115}$ or $\Delta C1_{113}$ fragments, with lengths of 113 and 115 residues, respectively, could be sufficient to adopt a specific transmissible prion structure, because the lack of WT C1 convertibility into prion was explained by its shortened size compared with C2 PrP^{res} fragments. Whether ΔC1 prion adopts a structure close to C2 but without the 15 or 30 N-terminal residues or a different structural organization remains an unresolved question. Δ^{Spont} and even more ΔC1 prions recall somehow PrP106, a mouse PrP with a double deletion (Δ23–88, Δ141–176), that produced a miniprion following infection by RML strain, but not spontaneously (56). The sequence of this mutant protein was very different from that of Δ190–196 ovine PrP or C1. The sequence of PrP106 contained ~20 residues upstream of the mouse C1 segment and a large internal deletion that removed H1, the β2 strand, and five N-terminal residues of H2 (56), together with the loops between H1 and H2 that are considered to be highly important for prion conversion (57–59). Although structurally different from ΔC1 prion, the miniprion is another example of prion entity constituted from elements of the PrP sequence. A third more distant example of short PrP sequence associated with prion formation is the human PrP with Tyr^{145}-Stop mutation associated with GSS (60). In contrast to the two precedent mutants, PrP Tyr^{145}-Stop conserves only the N-terminal moiety of PrP and lacks the whole globular helical domain. Δ^{Spont} and Δ190–196 C1 prions generated in this work are therefore original and attractive prion entities that deserve to be studied further with transgenic mouse models in the future.

Conclusion

We report the generation of a novel spontaneous mutant prion propagating in cell culture and conversion into prion of both the full-length and the C-terminal C1 fragment of Δ190–196 mutant PrP. We demonstrated that only 113 or 115 residues of the PrP C terminus are sufficient to constitute a self-replicating and transmissible prion entity. Our results also suggest also that the HTVTTTT conserved sequence in the H2 C terminus of PrP is important for prion protein stability and that removal of H2 C-terminal residues is required for productive infection in cells challenged by the spontaneous prion. This work also provides a unique cell culture model for spontaneous prion formation to further study the cell factors and molecular processes involved.

Experimental procedures

Plasmid constructs

Sheep Prnp ORF encoding PrP allotype VRQ (Val^{136}, Arg^{154}, and Gln^{171}) was cloned into pTRE plasmid of the pTeT-on expression system (Clontech) (27). Deletions of residues HTVTTTT (positions 190–196) and N-terminal deletions Δ25–112 and Δ25–114 to generate WT and mutant versions of $C1_{113}$ and $C1_{115}$ were performed by site-directed mutagenesis (QuikChange II mutagenesis kit; Stratagene). Each mutant construct was verified by sequencing.

Antibodies

The anti-PrP mAbs used were as follows: 4F2 directed to the octa-repeat domain (residues 62–94 according to sheep PrP numbering) (61, 62), 12B2 (residues 93–97) (63), 8G8 (residues 100–105) (61, 62), 6C2 (residues 114–121) (64) (Central Veterinary Institute, Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands) Sha31 (residues 148–155) (62) (Bertin Pharma), and 8F9 (residues 224–234) (65). Sha31and 8G8 were biotinylated and further detected with horseradish peroxidase–conjugated streptavidin. For other mAbs, secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Abliance) used at 1:5000.

Cell culture and isolation of rov cells

Rov cells are epithelial RK13 cells that stably express either WT or mutant ovine PrP in an inducible manner, by using a tetracycline-inducible system (27). They were obtained by transfection of cells by lipofectamine and puromycin selection. We used cell populations produced by a pool of puromycin-resistant cells, unless indicated otherwise. In some occasions, we used individual clones that were obtained by serial dilution of transfected cells in presence of the selecting agent. The cells were grown in Opti-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics and split at 1:4 after trypsin dissociation once a week. To express full-length PrP^{C} or C-terminal C1 polypeptides, the cells were cultivated in the continuous presence of 1 μg/ml of doxycycline (Sigma).

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

Prions and prion strains

The spontaneous mutant prion Δ^{Spont} was propagated on Rov cells expressing the Δ190–196 PrP mutant unless stated otherwise. The 127S ovine prion strain was isolated through serial transmission and cloning by limiting dilution of PG127 field scrapie isolate to tg338 transgenic mice expressing the VRQ allele of ovine PrP (66, 67). 127S was propagated on Rov cells expressing the WT PrP for comparative infection test or determination of PrP^{res} profile. $T1^{Ov}$ and $T2^{Ov}$ prions were originally isolated from serial transmission of a human sporadic CJD case (MM2 type) to tg338 mice (45). For comparison of PrP^{res} profiles with Δ^{Spont}, $T1^{Ov}$ and $T2^{Ov}$ strains were previously propagated on Rov cells expressing Δ193–196 mutant PrP (23).

Prion infection of cell cultures

To test the infectivity of cell cultures, cells were pelleted, frozen, and thawed three times and sonicated three times for 30 s, and the resulting homogenates were used as inocula to infect naive cell cultures as previously described (23, 68). Homogenates were left for 3 days on the challenged cells. They were then washed with PBS, trypsinized, and seeded at 1/10 dilution in fresh culture medium. The cells were then split at 1:4 dilution after 1 week of culture as for each other successive passage. For infection by Δ^{Spont} prion, homogenates of Δ190–196 Rov cells harvested at least 9 passages after the addition of doxycycline were used. To test for infectivity of Δ^{Spont} propagated on Rov cells expressing other deletion mutant PrP or C-terminal C1 polypeptides, inocula were made from cells harvested eight passages postexposure.

Cell lysis, protease digestion, and PNGase F treatment

The cells were washed twice with cold PBS, and whole-cell lysates were prepared in TL1 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Triton X-100). The lysates were clarified by centrifugation for 2 min at 800 × *g*, and protein concentrations were determined by microBCA assay (Pierce). For PrP^{res}, the lysates were incubated with 8 μg of PK per 1 mg of protein for 2 h at 37 °C and then centrifuged for 30 min at 22,000 × *g*. The pellets were dissolved in Laemmli sample buffer and boiled for 15 min at 100 °C. When needed, 500 units of PNGase F (New England BioLabs) and 1% Nonidet P-40 were added to denatured proteins that were further incubated at 37 °C overnight.

Sedimentation velocity fractionation

The experiments were performed as previously described (30). Briefly, the cells were solubilized by addition of a buffer containing 4% (w/v) dodecyl-β-D maltoside and benzonase (0.4 unit/μl). After incubation for 30 min at 37 °C, sarkosyl (*N*-lauryl sarcosine) was added to give a final concentration of 2% (w/v) in the samples. The incubation was pursued for 30 min at 37 °C. 150 μl of solubilized samples were carefully loaded on a 4.8-ml continuous 10–25% iodixanol gradient (Optiprep, Sigma–Aldrich), with final concentrations of 25 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% sarkosyl. The gradients were centrifuged at 285,000 × *g* at 4 °C for 45 min in a swinging-bucket SW-55 rotor. 30 fractions of 160 μl were collected and PK-treated at a final concentration of 50 μg/ml for 1 h at 37 °C. PrP^{res} contents were analyzed by Western blotting using a biotinylated anti-PrP Sha31 mAb. Signal intensities were quantified using ImageLab software (Bio-Rad) and converted into arbitrary units after normalization. A fixed quantity of human recombinant PrP was employed to calibrate the PrP signals in different gels.

Immunoblotting and detection of PrP^C and PrP^{res}

Either 4–12% NuPAGE Bis-Tris precast polyacrylamide gels (Invitrogen) or 12% Criterion XT Bis-Tris gels (Bio-Rad) were used for SDS-PAGE. For PrP^C analysis, 50 μg of protein per sample was loaded on the gel. For PrP^{res}, unless otherwise indicated, the samples corresponding to PK-resistant PrP contained in 25 or 50 μg of cell lysate protein were loaded onto the gel. The transfer of proteins, their detection, and their revelation were described previously (28, 69).

Immunofluorescence, image acquisition, and treatment

The cells were grown on plastic dishes or on glass coverslips in regular medium and washed twice with PBS before fixation for 10 min with 4% paraformaldehyde. The cells were then washed and incubated with the required monoclonal primary antibody (4F2 or Sha31, at 1:5000) in a blocking reagent buffer containing 0.5% crystallin (Roche Diagnostic) and 0.1% Tween 20 in PBS. After washing, the cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488–conjugated anti-mouse IgG antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) used at a 1:500 dilution, as previously reported (28, 70), and the nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). To specifically label the cell surface, rhodamine-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Invitrogen) was incubated for 5 min with living cells and washed once with PBS, and cells were further fixed and processed as described above. Images were acquired either with an Axio observer Z1 microscope (Zeiss) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and driven by the Axio-vision imaging system software. For some experiments, confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 700 microscope (MIMA2 Platform, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France) using a Plan-Neofluar 40× (NA 1.3) or Plan-Apochromat 63× (NA 1.4) oil-immersion objective. The images were analyzed using ImageJ version 1.49 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, RRID: SCR_003070).

Expression and purification of recombinant PrP

Recombinant proteins were produced and purified from *Escherichia coli* as published previously (23). Briefly, by site-directed mutagenesis the deletion Δ190–196 was introduced inside the sequence of the full-length ovine PrP (residues 25–234, VRQ allele) cloned into a pET28 expression vector. WT and mutant proteins produced by *E. coli* were purified by immobilized metal affinity chromatography on Nickel columns.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

CD

The secondary structure of recombinant PrP produced by *E. coli* was analyzed by CD. Measurements were carried out on Jasco-810 spectropolarimeter. Far-UV CD spectra of full-length ovine PrP and the deletion mutant 190–196 were recorded from 260 to 180 nm at 25°C in 1-μm-path-length quartz cuvette at a protein concentration of 50 μM in 10 mM sodium acetate buffer at pH 5.0. Each CD spectrum was obtained by averaging six scans collected at a scan rate of 200 nm/min. Baseline spectra obtained with buffer were subtracted for all spectra.

NMR

2D ^{1}H-^{15}N HSQC and 3D HNCA spectra of 250 μM recombinant ^{15}N^{13}C-labeled Δ190–196 C1$_{113}$ in 10 mM sodium acetate, pH 5 buffer were acquired on a Bruker NMR AVANCE III spectrometer equipped with a cryoprobe at a magnetic field of 18.8 T and a temperature of 298 K. ^{13}Cα chemical shifts were analyzed by TALOS-N software by excluding similar sequences (71)

Fluorescence-based thermal shift assay

Reaction mixtures containing 10 or 20 μM of recombinant PrP in 10 mM sodium acetate, pH 5.0, and SYPRO orange (diluted 500-fold from a 5000-fold stock solution; Invitrogen) were made in duplicate in a 96-well fast PCR plate at a final volume of 20 μl. The experiments were also reproduced in a buffer of 250 mM sodium phosphate, pH 5.1 (Fig. S2). The temperature gradient was carried out in the range of 10 °C to 95 °C, at 3 °C/min with a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) as previously described (72, 74, 75). Fluorescence was recorded as a function of temperature in real time (excitation with a blue LED source and emission filtered through a 5-carboxyl-X-rhodamine emission filter). The melting temperature (T_m) was calculated with the StepOne software v1.3 (Applied Biosystems) as the maximum of the derivative of the resulting SYPRO Orange fluorescence curves.

Data availability

All of the data in this study are contained within the article.

Acknowledgments—We are grateful to the Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods platform at l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement and especially to Pierre Adenot for confocal facilities. We are grateful for Ile-de-France region (DIM 1Health) and the French Fondation pour la Recherche Médicale for their support and D. L. acknowledges ED ABIES of Paris–Saclay University for doctoral training.

Author contributions—C. M.-M., D. L., and M. D. conceptualization; C. M.-M., D. L., C. B., A. I.-E., S. T., E. J., N. N., M. M., C. S., and M. D. investigation; C. S., V. B., and M. D. writing-review and editing; H. R. and V. B. funding acquisition; M. D. supervision; M. D. validation; M. D. writing-original draft.

Funding and additional information—This work was primarily supported by Fondation pour la Recherche Médicale Grant DEQ20150331689 and by the Conseil Regional, Ile-de-France (DIM 1Health). C. M.-M. was supported by postdoctoral fellowships from CONICYT-Becas Chile and DEFRA (United Kingdom), and D. L. was supported by a doctoral fellowship of Ile-de-France region (DIM 1Health). The master traineeships of C. B. were supported by l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: PrP, prion protein; PK, proteinase K; CJD, Creutzfeldt–Jakob disease; GSS, Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; PNGase F, peptide:N-glycosidase F; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; WGA, white germ agglutinin.

References

1. Prusiner, S. B. (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* **47,** 601–623 CrossRef Medline
2. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López García, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., and Wüthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97,** 145–150 CrossRef Medline
3. Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216,** 136–144 CrossRef Medline
4. Come, J. H., Fraser, P. E., and Lansbury, P. T.. Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90,** 5959–5963 CrossRef Medline
5. Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., and Caughey, B. (2014) Parallel in-register intermolecular β-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J. Biol. Chem.* **289,** 24129–24142 CrossRef Medline
6. Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., Biasini, E., and Requena, J. R. (2019) Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog.* **15,** e1007864 CrossRef Medline
7. Baskakov, I. V., Caughey, B., Requena, J. R., Sevillano, A. M., Surewicz, W. K., and Wille, H. (2019) The prion 2018 round tables (I): the structure of PrP(Sc). *Prion* **13,** 46–52 CrossRef Medline
8. 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 CrossRef Medline
9. Fischer, M., Rülicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15,** 1255–1264 CrossRef Medline
10. Rossi, M., Baiardi, S., and Parchi, P. (2019) Understanding prion strains: evidence from studies of the disease forms affecting humans. *Viruses* **11,** 309 CrossRef Medline
11. Dickinson, A. G., Meikle, V. M., and Fraser, H. (1968) Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J. Comp. Pathol.* **78,** 293–299 CrossRef Medline
12. Mangé, A., Béranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., and Lehmann, S. (2004) Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol. Cell* **96,** 125–132 CrossRef Medline
13. Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rülicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93,** 203–214 CrossRef Medline
14. Westergard, L., Turnbaugh, J. A., and Harris, D. A. (2011) A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant-negative inhibitor of PrPSc formation. *J. Biol. Chem.* **286,** 44234–44242 CrossRef Medline

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

15. Cobb, N. J., and Surewicz, W. K. (2009) Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* **48,** 2574–2585 CrossRef Medline
16. Mead, S., Lloyd, S., and Collinge, J. (2019) Genetic factors in mammalian prion diseases. *Annu. Rev. Genet.* **53,** 117–147 CrossRef Medline
17. Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Watson, N. E., King, O. D., Faas, H., Jasanoff, A., and Lindquist, S. (2013) Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110,** 14759–14764 CrossRef Medline
18. Friedman-Levi, Y., Meiner, Z., Canello, T., Frid, K., Kovacs, G. G., Budka, H., Avrahami, D., and Gabizon, R. (2011) Fatal prion disease in a mouse model of genetic E200K Creutzfeldt–Jakob disease. *PLoS Pathog.* **7,** e1002350 CrossRef Medline
19. Watts, J. C., and Prusiner, S. B. (2017) Experimental models of inherited PrP prion diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7,** a027151 CrossRef Medline
20. Stöhr, J., Watts, J. C., Legname, G., Oehler, A., Lemus, A., Nguyen, H. O., Sussman, J., Wille, H., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Giles, K. (2011) Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108,** 21223–21228 CrossRef Medline
21. Watts, J. C., Giles, K., Bourkas, M. E., Patel, S., Oehler, A., Gavidia, M., Bhardwaj, S., Lee, J., and Prusiner, S. B. (2016) Towards authentic transgenic mouse models of heritable PrP prion diseases. *Acta Neuropathol.* **132,** 593–610 CrossRef Medline
22. Dima, R. I., and Thirumalai, D. (2004) Probing the instabilities in the dynamics of helical fragments from mouse PrPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101,** 15335–15340 CrossRef Medline
23. Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Chapuis, J., Ciric, D., Igel-Egalon, A., Laude, H., Béringue, V., Rezaei, H., and Dron, M. (2016) Generating *bona fide* mammalian prions with internal deletions. *J. Virol.* **90,** 6963–6975 CrossRef Medline
24. Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Igel-Egalon, A., Barbereau, C., Chapuis, J., Ciric, D., Laude, H., Béringue, V., Rezaei, H., and Dron, M. (2017) A stretch of residues within the protease-resistant core is not necessary for prion structure and infectivity. *Prion* **11,** 25–30 CrossRef Medline
25. Bae, S. H., Legname, G., Serban, A., Prusiner, S. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2009) Prion proteins with pathogenic and protective mutations show similar structure and dynamics. *Biochemistry* **48,** 8120–8128 CrossRef Medline
26. Lee, J., and Chang, I. (2019) Structural insight into conformational change in prion protein by breakage of electrostatic network around H187 due to its protonation. *Sci. Rep.* **9,** 19305 CrossRef Medline
27. Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., and Laude, H. (2001) *Ex vivo* propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98,** 4055–4059 CrossRef Medline
28. Salamat, M. K., Dron, M., Chapuis, J., Langevin, C., and Laude, H. (2011) Prion propagation in cells expressing PrP glycosylation mutants. *J. Virol.* **85,** 3077–3085 CrossRef Medline
29. Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., and Béringue, V. (2010) The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog.* **6,** e1000859 CrossRef Medline
30. Igel-Egalon, A., Moudjou, M., Martin, D., Busley, A., Knäpple, T., Herzog, L., Reine, F., Lepejova, N., Richard, C. A., Béringue, V., and Rezaei, H. (2017) Reversible unfolding of infectious prion assemblies reveals the existence of an oligomeric elementary brick. *PLoS Pathog.* **13,** e1006557 CrossRef Medline
31. Tveit, H., Lund, C., Olsen, C. M., Ersdal, C., Prydz, K., Harbitz, I., and Tranulis, M. A. (2005) Proteolytic processing of the ovine prion protein in cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337,** 232–240 CrossRef Medline
32. Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Faas, H., Steele, A. D., King, O. D., Watson, N., Jasanoff, A., and Lindquist, S. (2009) Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron* **63,** 438–450 CrossRef Medline
33. Mercer, R. C. C., Daude, N., Dorosh, L., Fu, Z. L., Mays, C. E., Gapeshina, H., Wohlgemuth, S. L., Acevedo-Morantes, C. Y., Yang, J., Cashman, N. R., Coulthart, M. B., Pearson, D. M., Joseph, J. T., Wille, H., Safar, J. G., *et al.* (2018) A novel Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease mutation defines a precursor for amyloidogenic 8 kDa PrP fragments and reveals N-terminal structural changes shared by other GSS alleles. *PLoS Pathog.* **14,** e1006826 CrossRef Medline
34. Colucci, M., Moleres, F. J., Xie, Z. L., Ray-Chaudhury, A., Gutti, S., Butefisch, C. M., Cervenakova, L., Wang, W., Goldfarb, L. G., Kong, Q., Ghetti, B., Chen, S. G., and Gambetti, P. (2006) Gerstmann–Sträussler–Scheinker: a new phenotype with "curly" PrP deposits. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65,** 642–651 CrossRef Medline
35. Finckh, U., Müller-Thomsen, T., Mann, U., Eggers, C., Marksteiner, J., Meins, W., Binetti, G., Alberici, A., Sonderegger, P., Hock, C., Nitsch, R. M., and Gal, A. (2000) High frequency of mutations in four different disease genes in early-onset dementia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **920,** 100–106 CrossRef Medline
36. Di Fede, G., Catania, M., Atzori, C., Moda, F., Pasquali, C., Indaco, A., Grisoli, M., Zuffi, M., Guaita, M. C., Testi, R., Taraglio, S., Sessa, M., Gusmaroli, G., Spinelli, M., Salzano, G., *et al.* (2019) Clinical and neuropathological phenotype associated with the novel V189I mutation in the prion protein gene. *Acta Neuropathol. Commun.* **7,** 1 CrossRef Medline
37. Kotta, K., Paspaltsis, I., Bostantjopoulou, S., Latsoudis, H., Plaitakis, A., Kazis, D., Collinge, J., and Sklaviadis, T. (2006) Novel mutation of the PRNP gene of a clinical CJD case. *BMC Infect. Dis.* **6,** 169 CrossRef Medline
38. van der Kamp, M. W., and Daggett, V. (2010) Pathogenic mutations in the hydrophobic core of the human prion protein can promote structural instability and misfolding. *J. Mol. Biol.* **404,** 732–748 CrossRef Medline
39. Xu, Z., Liu, H., Wang, S., Zhang, Q., Yao, X., Zhou, S., and Liu, H. (2020) Unraveling the molecular mechanism of prion H2 C-terminus misfolding by metadynamics simulations. *ACS Chem. Neurosci.* **11,** 772–782 CrossRef Medline
40. Hadzi, S., Ondracka, A., Jerala, R., and Hafner-Bratkovic, I. (2015) Pathological mutations H187R and E196K facilitate subdomain separation and prion protein conversion by destabilization of the native structure. *FASEB J.* **29,** 882–893 CrossRef Medline
41. Hosszu, L. L., Tattum, M. H., Jones, S., Trevitt, C. R., Wells, M. A., Waltho, J. P., Collinge, J., Jackson, G. S., and Clarke, A. R. (2010) The H187R mutation of the human prion protein induces conversion of recombinant prion protein to the PrP(Sc)-like form. *Biochemistry* **49,** 8729–8738 CrossRef Medline
42. Malevanets, A., Chong, P. A., Hansen, D. F., Rizk, P., Sun, Y., Lin, H., Muhandiram, R., Chakrabartty, A., Kay, L. E., Forman-Kay, J. D., and Wodak, S. J. (2017) Interplay of buried histidine protonation and protein stability in prion misfolding. *Sci. Rep.* **7,** 882 CrossRef Medline
43. Singh, J., Kumar, H., Sabareesan, A. T., and Udgaonkar, J. B. (2014) Rational stabilization of helix 2 of the prion protein prevents its misfolding and oligomerization. *J. Am. Chem. Soc.* **136,** 16704–16707 CrossRef Medline
44. Abskharon, R., Wang, F., Vander Stel, K. J., Sinniah, K., and Ma, J. (2016) The role of the unusual threonine string in the conversion of prion protein. *Sci. Rep.* **6,** 38877 CrossRef Medline
45. Chapuis, J., Moudjou, M., Reine, F., Herzog, L., Jaumain, E., Chapuis, C., Quadrio, I., Boulliat, J., Perret-Liaudet, A., Dron, M., Laude, H., Rezaei, H., and Béringue, V. (2016) Emergence of two prion subtypes in ovine PrP transgenic mice infected with human MM2-cortical Creutzfeldt–Jakob disease prions. *Acta Neuropathol. Commun.* **4,** 10 CrossRef Medline
46. Corda, E., Du, X., Shim, S. Y., Klein, A. N., Siltberg-Liberles, J., and Gilch, S. (2018) Interaction of peptide aptamers with prion protein central domain promotes α-cleavage of PrP(C). *Mol. Neurobiol.* **55,** 7758–7774 CrossRef Medline
47. Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E., and Checler, F. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **276,** 37743–37746 CrossRef Medline
48. Altmeppen, H. C., Prox, J., Puig, B., Kluth, M. A., Bernreuther, C., Thurm, D., Jorissen, E., Petrowitz, B., Bartsch, U., De Strooper, B., Saftig, P., and

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

ASBMB

Glatzel, M. (2011) Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein *in vivo*. *Mol. Neurodegener*. **6,** 36 CrossRef Medline

49. Liang, J., Wang, W., Sorensen, D., Medina, S., Ilchenko, S., Kiselar, J., Surewicz, W. K., Booth, S. A., and Kong, Q. (2012) Cellular prion protein regulates its own α-cleavage through ADAM8 in skeletal muscle. *J. Biol. Chem*. **287,** 16510–16520 CrossRef Medline
50. Wik, L., Klingeborn, M., Willander, H., and Linne, T. (2012) Separate mechanisms act concurrently to shed and release the prion protein from the cell. *Prion* **6,** 498–509 CrossRef Medline
51. Walmsley, A. R., Watt, N. T., Taylor, D. R., Perera, W. S., and Hooper, N. M. (2009) α-Cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Mol. Cell. Neurosci*. **40,** 242–248 CrossRef Medline
52. Oliveira-Martins, J. B., Yusa, S., Calella, A. M., Bridel, C., Baumann, F., Dametto, P., and Aguzzi, A. (2010) Unexpected tolerance of alpha-cleavage of the prion protein to sequence variations. *PLoS One* **5,** e9107 CrossRef Medline
53. Lewis, V., Hill, A. F., Haigh, C. L., Klug, G. M., Masters, C. L., Lawson, V. A., and Collins, S. J. (2009) Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. **68,** 1125–1135 CrossRef Medline
54. Seuberlich, T., Gsponer, M., Drögemüller, C., Polak, M. P., McCutcheon, S., Heim, D., Oevermann, A., and Zurbriggen, A. (2012) Novel prion protein in BSE-affected cattle, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis*. **18,** 158–159 CrossRef Medline
55. Serra, F., Dudas, S., Torres, J. M., Anderson, R., Oevermann, A., Espinosa, J. C., Czub, S., and Seuberlich, T. (2018) Presumptive BSE cases with an aberrant prion protein phenotype in Switzerland, 2011: lack of prion disease in experimentally inoculated cattle and bovine prion protein transgenic mice. *Transbound. Emerg. Dis*. **65,** 1348–1356 CrossRef Medline
56. Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Scott, M. (1999) Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* **96,** 869–878 CrossRef Medline
57. Kurt, T. D., Bett, C., Fernández-Borges, N., Joshi-Barr, S., Hornemann, S., Rülicke, T., Castilla, J., Wüthrich, K., Aguzzi, A., and Sigurdson, C. J. (2014) Prion transmission prevented by modifying the $\beta2$–$\alpha2$ loop structure of host PrPC. *J. Neurosci*. **34,** 1022–1027 CrossRef Medline
58. Caldarulo, E., Barducci, A., Wüthrich, K., and Parrinello, M. (2017) Prion protein $\beta2$–$\alpha2$ loop conformational landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*. **114,** 9617–9622 CrossRef Medline
59. Christen, B., Damberger, F. F., Pérez, D. R., Hornemann, S., and Wüthrich, K. (2013) Structural plasticity of the cellular prion protein and implications in health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **110,** 8549–8554 CrossRef Medline
60. Choi, J. K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2016) Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. **113,** 13851–13856 CrossRef Medline
61. Féraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Créminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., and Grassi, J. (2005) Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J. Biol. Chem*. **280,** 11247–11258 CrossRef Medline
62. Krasemann, S., Groschup, M., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1996) Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrPo/o mice. *J. Immunol. Methods* **199,** 109–118 CrossRef Medline
63. Langeveld, J. P., Jacobs, J. G., Erkens, J. H., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., and van Keulen, L. J. (2006) Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet. Res*. **2,** 19 CrossRef Medline
64. Rigter, A., Langeveld, J. P., Timmers-Parohi, D., Jacobs, J. G., Moonen, P. L., and Bossers, A. (2007) Mapping of possible prion protein self-interaction domains using peptide arrays. *BMC Biochem*. **8,** 6 CrossRef Medline
65. Pan, T., Chang, B., Wong, P., Li, C., Li, R., Kang, S. C., Robinson, J. D., Thompsett, A. R., Tein, P., Yin, S., Barnard, G., McConnell, I., Brown, D. R., Wisniewski, T., and Sy, M. S. (2005) An aggregation-specific enzyme-linked immunosorbent assay: detection of conformational differences between recombinant PrP protein dimers and PrP(Sc) aggregates. *J. Virol*. **79,** 12355–12364 CrossRef Medline
66. Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., *et al.* (2001) Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J. Virol*. **75,** 5977–5984 CrossRef Medline
67. Langevin, C., Andréoletti, O., Le Dur, A., Laude, H., and Béringue, V. (2011) Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis*. **41,** 219–225 CrossRef Medline
68. Salamat, K., Moudjou, M., Chapuis, J., Herzog, L., Jaumain, E., Béringue, V., Rezaei, H., Pastore, A., Laude, H., and Dron, M. (2012) Integrity of helix 2–helix 3 domain of the PrP protein is not mandatory for prion replication. *J. Biol. Chem*. **287,** 18953–18964 CrossRef Medline
69. Dron, M., Moudjou, M., Chapuis, J., Salamat, M. K., Bernard, J., Cronier, S., Langevin, C., and Laude, H. (2010) Endogenous proteolytic cleavage of disease-associated prion protein to produce C2 fragments is strongly cell- and tissue-dependent. *J. Biol. Chem*. **285,** 10252–10264 CrossRef Medline
70. Dron, M., Dandoy-Dron, F., Farooq Salamat, M. K., and Laude, H. (2009) Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. *J. Gen. Virol*. **90,** 2050–2060 CrossRef Medline
71. Shen, Y., and Bax, A. (2013) Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. *J. Biomol. NMR* **56,** 227–241 CrossRef Medline
72. Grzela, R., Nusbaum, J., Fieulaine, S., Lavecchia, F., Desmadril, M., Nhiri, N., Van Dorsselaer, A., Cianferani, S., Jacquet, E., Meinnel, T., and Giglione, C. (2018) Peptide deformylases from *Vibrio parahaemolyticus* phage and bacteria display similar deformylase activity and inhibitor binding clefts. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom*. **1866,** 348–355 CrossRef Medline
73. Gielbert, A., Davis, L. A., Sayers, A. R., Hope, J., Gill, A. C., and Sauer, M. J. (2009) High-resolution differentiation of transmissible spongiform encephalopathy strains by quantitative N-terminal amino acid profiling (N-TAAP) of PK-digested abnormal prion protein. *J. Mass Spectrom*. **44,** 384–396 CrossRef Medline
74. Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A., and Prusiner, S. B. (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* **51,** 651–662 CrossRef Medline
75. Barron, R. M., Baybutt, H., Tuzi, N. L., McCormack, J., King, D., Moore, R. C., Melton, D. W., and Manson, J. C. (2005) Polymorphisms at codons 108 and 189 in murine PrP play distinct roles in the control of scrapie incubation time. *J. Gen. Virol*. **86,** 859–868 CrossRef Medline

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INRAE Inst Natl Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement on December 4, 2020

Supporting information

```
Ovine       CVNITVKQHTVTTTTKGENFT
Bovine      CVNITVKEHTVTTTTKGENFT
Cervid      CVNITVKQHTVTTTTKGENFT
Hamster     CVNITIKQHTVTTTTKGENFT
Mouse a     CVNITIKQHTVTTTTKGENFT
Mouse b     CVNITIKQHTVVTTTKGENFT

Human       CVNITIKQHTVTTTTKGENFT
GSS         CVNITIKQRTVTTTTKGENFT
CJD         CVNITIKQHKVTTTTKGENFT
CJD         CVNITIKQHTITTTTKGENFT
CJD         CVNITIKQHTVTTTIKGENFT
```

Figure S1. The HTVTTTT sequence (in red) is conserved in mammals and allelic variation or point mutations associated with prion diseases are indicated in blue. In mouse strains, two PrP alleles with two different codons modulate TSE incubation time (74). $Prnp^{a}$ (108L and 189T) is the most frequent allele and is associated with short incubation time, while $Prnp^{b}$ (108F and 189V) is associated with longer incubation time. Both codons 108 and 189, according to mouse PrP numbering, were found to play a role in the control of the incubation time (75). Mouse Codon 189 is equivalent to codon 193 in ovine PrP. Replacement of four of HTVTTTT residues in position 187 to 193 according to human numbering were reported associated with CJD or GSS. Mutations H187R (34) and V189I (35) are associated with pathogenesis (16), while T188K (36) is probably associated but might not be fully penetrant and T193I (37) has been reported only for one patient to date.

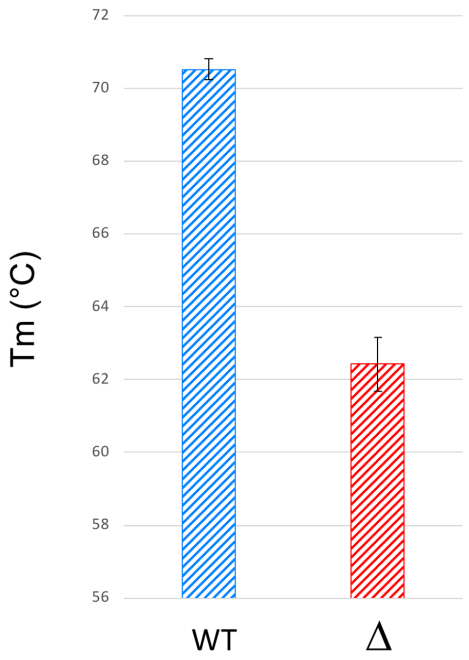

Figure S2. Comparative stability of WT and Δ190-196 full-length PrPs in 250 mM phosphate buffer at pH 5.1. Melting temperatures (Tm) of full-length proteins: WT PrP (blue, 70.5 °C ± 0.3 °C) and Δ190-196 PrP (red, 62.4 °C ± 0.7 °C). Means and standard deviations are from 4 experiments.

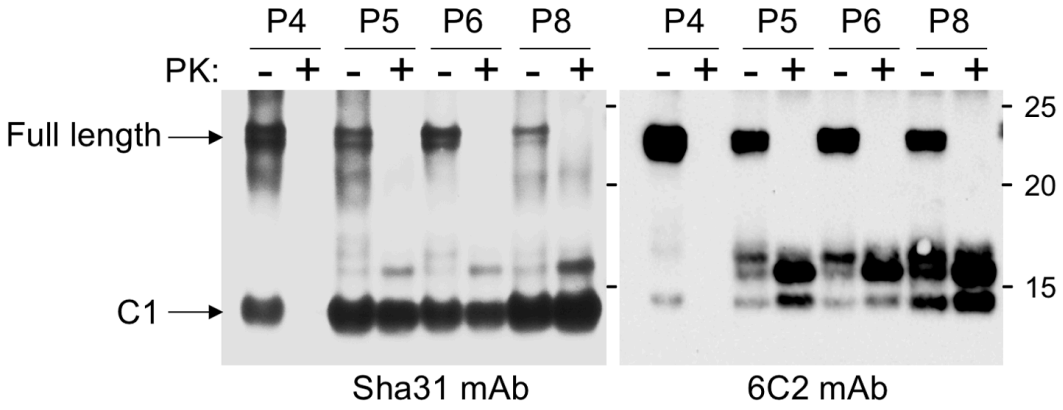

Figure S3. 6C2-positive PrP^{res} fragments within the large, Sha31-positive 14 kDa PrP^{res} fragment from Δ^{Spont} prions. Western blot pattern of PNGase F-treated PrP^{res} samples on serial passage of Δ190-196 Rov cells, as revealed by Sha31 mAb or 6C2 mAb. Only high-molecular fragments from the 14 kDa species were 6C2 positive.

3. Discussion de la partie 1

Ce travail se concentre sur la conversion spontanée dans la cellule d'une PrP présentant une délétion en une nouvelle forme de prion. Le prion que nous avons appelé Δ^{Spont} présente trois caractéristiques originales : une délétion interne de sept résidus dans le noyau résistant aux protéases, une signature inhabituelle de la PrP^{res} et une capacité remarquable à se propager sur le segment homologue C-terminal C1. En outre, ce travail fournit un modèle cellulaire unique pour comprendre les processus cellulaires et identifier des facteurs associés à l'émergence spontanée de prions.

La conversion spontanée de la PrP en prion est un événement rare chez l'homme mais certaines mutations dans la séquence de la PrP humaine et la surexpression de PrP mutées chez l'animal engendrent la formation spontanée de prion (Mead *et al*., 2019 ; Jackson *et al*., 2013 ; Friedman-Levi *et al*., 2011 ; Watt et Prusiner., 2017 ; Jackson *et al*., 2009 ; Mercer *et al*., 2018). Dans des travaux précédents nous avions montré que la suppression de quatre thréonines (193-TTTT-196) à la fin de l'hélice H2 favorisait la réplication de souches de prion difficiles à propager dans des cellules exprimant la PrP ovine WT (Munoz-Montesino *et al*., 2017). Cette délétion a constitué un bon point de départ dans notre projet visant à permettre l'émergence d'un prion spontané en cellule. Nous l'avons donc étendue aux trois résidus en amont 190-HTV-192 conservés dans la PrP humaine et associés à des mutations pathogènes (H187R, T188K, et V189I) indiquant leur importance pour la préservation de la forme normale de la protéine (Colluci *et al*., 2006 ; Finckh *et al*., 2000 ; Di Fede *et al*., 2019 ; Kotta *et al*., 2006). La délétion simultanée des résidus 190-HTVTTTT-196 maintient la structure globale de la PrP ovine mais réduit fortement sa stabilité, ce qui peut provoquer un dépliement partiel de la protéine facilitant ainsi sa conversion vers une forme mal repliée (van der Kamp *et al*., 2010). La baisse de stabilité introduite par la délétion pourrait être liée à des perturbations dans l'équilibre de charge, les ponts salins et/ou les interactions hydrophobes. En effet l'Histidine en position 187 chez l'homme ou His190 chez l'ovin, est considérée comme un résidu clé au sein d'un réseau électrostatique stabilisant le domaine globulaire hélicoïdal (Lee et Chang., 2019 ; Xu *et al*., 2020). La suppression de ce résidu pourrait avoir contribué à la déstabilisation de la PrP mutante. La haute conservation de la séquence HTVTTTT pourrait indiquer la préservation d'une région importante pour la dynamique et le maintien du repliement hélicoïdal de la PrP dans son contexte cellulaire.

Le prion émergent produit spontanément par les cellules exprimant la PrPΔ190-196 est agrégé, insoluble et résistant aux protéases, il s'auto-propage et est transmissible à d'autres cellules. Il possède donc toutes les caractéristiques habituelles de prions propagés en culture cellulaire. De plus ce prion est infectieux pour un clone cellulaire particulier exprimant la PrP mutée mais ne formant pas spontanément de prion, mais aussi pour des cellules n'exprimant que le fragment C1 muté ou bien des PrP avec des mutations proches ne produisant pas non plus spontanément de forme prion. En revanche, la conversion de la PrP sauvage par les prions de Δ^{Spont} a échoué malgré l'utilisation de différentes populations cellulaires y compris le clone historique Rov 9 ou des clones encore plus sensibles aux prions isolés plus récemment.

Le profil PrP^{res} de Δ^{Spont} est non conventionnel et complexe avec une bande prédominante à 14kDa qui correspond à la taille du fragment C1 de la PrP, ce qui est exceptionnel pour un prion. On y trouve aussi une bande de 16kDa moins représentée qui est proche, peut-être légèrement plus courte, que la PrP^{res} des prions de type 2 et en proportion très minoritaire de la PrP^{res} qui pourrait correspondre à des fragments plus grands assimilables à ceux produits par les prions de type1. Le profil non conventionnel de la PrP^{res} du prion Δ^{Spont} suggère une organisation structurale originale et pourrait s'expliquer par la conversion de deux substrats, la protéine de pleine longueur et son fragment C1, plutôt que celle de la seule PrP entière comme pour les prions plus classiques.

Le consensus actuel est que le fragment C1 de la PrP^{C} est plus court que le domaine PrP^{res} et ne peut donc pas être converti en prion et qu'il pourrait même avoir un effet inhibiteur compétitif sur la conversion de la PrP^{C} (Westergard *et al*., 2011 ; Lewis *et al*., 2009), même si ce dernier point nous parait très discutable. Nous avons trouvé ici des résultats différents puisque le prion Δ^{Spont} est capable de convertir le C1 homologue vers une forme résistante aux protéases présentant les caractéristiques typiques d'un prion se propageant en culture cellulaire. La forme prion du C1 est transmissible *de novo* aux cellules qui expriment soit la même protéine C1, soit la PrP mutante homologue pleine longueur ou des PrP mutantes étroitement apparentées. À notre connaissance, il n'y a pas d'autre rapport d'une conversion confirmée de polypeptides C1 ou de type C1. Deux cas présumés d'encéphalopathie spongiforme bovine avec une signature PrP^{res} de type C1 ont été signalés, mais ils se sont finalement révélés dépourvus d'infectiosité (Seuberlich *et al*., 2012 ; Serra *et al*., 2018). La conversion exceptionnelle du segment Δ190-196 C1 en prion après infection

par le prion non conventionnel Δ^{Spont} est probablement due conjointement à la modification de séquence introduite dans le polypeptide et à l'adoption d'une structure mal repliée significativement différente de celle des autres prions. Les prions Δ^{Spont} et Δ190-196 $C1^{Sc}$ générés dans ce travail sont donc des entités prions originales et attrayantes qui méritent d'être étudiées plus avant avec des modèles de souris transgéniques dans le cadre de la recherche sur les maladies infectieuses.

4. Conclusion de la partie 1

Ce travail a permis de générer un nouveau type prion capable d'émerger spontanément d'une culture cellulaire et de s'y propager via la conversion de la PrP mutante Δ190-196 de pleine longueur ou de son fragment C-terminal C1. Nous avons ainsi démontré que seulement 113 ou 115 résidus de l'extrémité C-terminale de la PrP sont suffisants pour constituer une entité prion auto-réplicative et transmissible. Nos résultats suggèrent également que la séquence conservée HTVTTTT dans l'extrémité C-terminale de l'hélice alpha 2 de la PrP est importante pour la stabilité de la protéine prion et que l'élimination d'au moins une partie des résidus C-terminaux de l'hélice est nécessaire pour que le prion mutant puisse exercer son pouvoir de conversion. Ce travail fournit également un modèle unique de culture cellulaire pour étudier les processus moléculaires et rechercher les facteurs cellulaires impliqués dans la formation spontanée des prions.

5. Travaux en cours et perspectives de la partie 1

Les perspectives ouvertes par ces travaux sont nombreuses mais nous n'en aborderons que quelques-unes pour lesquelles des travaux ont été engagés dans ces directions, excepté l'approche vers la structure des fibres amyloïdes correspondant au prion Δ^{Spont} qui est décrite en détail dans les parties 2 et 3 de ce mémoire. Les perspectives principales peuvent se décliner ainsi :

- Construction de souris transgéniques pour propager les prions Δ^{Spont} et Δ190-196 C1 *in vivo*
- Recherche de facteurs cellulaires impliqués dans la formation spontanée du prion.
- Délétion du segment HTVTTTT dans la PrP humaine ou d'autres espèces animales.
- Identification d'autres mutations induisant la formation de prion spontané dans la cellule.

1) Propagation des prions Δ^{Spont} *in vivo*.

Les prions n'ont pas d'effet cytopathogène reconnu dans les cultures de cellule même si nous avons noté une certaine vacuolisation, parfois même marquée, lorsque le prion spontané émerge dans certains clones cellulaires. Pour déterminer la pathogénicité d'un prion il faut donc utiliser des modèles animaux. Le problème est que le prion spontané, Δ^{Spont} ne se propage pas sur la PrP sauvage, au moins dans les cellules RK13 et que nous ne disposons pas pour le moment de souris transgéniques pour la PrP ovine Δ190-196. Dans la mesure où les souris transgéniques de la lignée Tg338 qui expriment la PrP ovine sauvage peuvent être jusqu'à 1000 fois plus sensibles aux prions que le système cellulaire utilisé nous avons quand même inoculé Δ^{Spont}.

Au premier passage aucune souris n'est tombée malade (n=12 inoculées) mais 30% d'entre elles présentaient de la PrP^{res} dans la rate, mais pas dans le cerveau au bout de 600 jours à 650 jours après l'inoculation. Lors de franchissement de barrière d'espèces, nous avons observé au laboratoire que la rate était plus permissive que le cerveau aux prions d'autres espèces (Beringue *et al.*, 2012). Ce phénomène s'est peut-être reproduit ici. Après traitement à la PNGase la PrP^{res} accumulée dans la rate s'est avérée avoir la taille du fragment C1 de la PrP sauvage. Un second passage a été effectué par inoculation intracérébrale des extraits de rates positives et de cerveaux correspondant. Dans ce second passage à partir de la rate, les souris n'ont manifesté aucun signe clinique (temps de survie entre 414 et 790 jours) et ont été négatives pour la PrP^{res}, que ce soit dans la rate ou le cerveau. Pour les cerveaux inoculés, les transmissions se sont également révélées négatives (temps de survie entre 379 et 881 jours).

Des cas de transmission positifs au 1er passage et négatif ensuite ont été reportés dans la littérature (Mansonet *et al* 1999 ; Telling *et al*., 2017) et sont associés à une infection non-productive. Peut-être ce qui a été observé ici.

Une seconde lignée transgénique surexprimant environ 20 fois la PrP murine (Tg20) a également été inoculée avec Δ^{Spont} (n= 10) dans la mesure ou certaines souches s'adaptent en franchissant une barrière d'espèce. Le rationnel d'utiliser ces souris était également que les prions spontanés de TgVole I109 passent facilement en Tg20. Au premier passage une faible quantité de PrP^{res} a été détectée dans le cerveau de 5 souris sur les 10 inoculées. Au second passage, les souris ont été inoculées avec un pool de trois cerveaux positifs. Ces souris sont mortes (5/5) avec des signes cliniques évocateur de maladie à prions (cyphose, queue raide, amaigrissement prononcé) avec un temps d'incubation moyen de 514 +/- 5 jours. Toutes les souris analysés (incluant une morte à 432j) souris présentaient de la PrP^{res} avec une bande basse de 10K rappelant le profil atypique de la souche Nor 98. Au 3ème passage, le temps d'incubation est de 487+/-14j avec signes cliniques. En revanche, pas d'accumulation de PrPres (à confirmer).

Une troisième lignée transgénique surexprimant environ 5 fois la PrP de hamster (tg7) a finalement été inoculée avec Δ^{Spont} (n= 10), car ces souris sont particulièrement susceptibles aux prions synthétiques et accumulent en réponse à ces prions des formes de PrP^{res} avec un profil électrophorétique rappelant celui de Δ^{Spont} (données non publiées). Sur les 10 souris inoculées, aucune n'a développé de signes cliniques Trois semblent avoir accumulé des formes basses de PrP^{res} (à retester). Un second passage est prévu.
Au vu de ces résultats il semble que nous ne soyons pas parvenus à propager et à adapter la souche Δ^{Spont} in vivo sur une PrP sauvage, même si la présence de ce prion pourrait avoir favorisé des changements de conformation de la PrP chez certains animaux. Ces résultats de même que ceux obtenus en culture de cellule suggèrent une incompatibilité entre le prion spontané et la PrP sauvage, vraisemblablement à cause de la délétion qui fait que le prion spontané ne peut plus servir de modèle structural adéquat à une PrP qui a 7 acides aminés consécutifs en trop par rapport à lui.

En conclusion : la perspective de construire des souris transgéniques pour la PrP ovine Δ190-196 et/ou son segment C1 uniquement restent donc incontournable et extrêmement attrayante pour déterminer si ces formes mutantes de prions sont pathogènes in vivo et avec des

caractéristiques neuropathologiques semblables ou au contraire différentes de celles observées pour des souches de prions plus classiques.

2) Recherche de facteurs cellulaires partenaires ou inhibiteurs de la conversion spontanée.

Les processus et facteurs cellulaires impliqués dans l'émergence des prions restent inconnus. Nous pourrions en identifier certains avec notre système en comparant le transcriptome de clones permettant ou au contraire ne permettant pas la formation spontanée du prion Δ^{Spont}. Pour ce faire étant donné la variabilité chromosomique importante de ce type de lignée de cellule épithéliale il faudrait pouvoir comparer au moins 5 à10 clones permissifs avec le même nombre de clones non permissifs pour la formation spontanée de Δ^{Spont}. Nous disposons déjà de toute une série de clones produisant Δ^{Spont}, mais encore trop peu de clones non permissifs. Il faudra donc en isoler d'autres, voir idéalement repartir d'un clone RK13 unique pour isoler des sous clones positifs ou négatifs. Le séquençage des ARNs ou l'utilisation de puces à ADN pourrait permettre d'identifier des protéines candidates dont l'implication devra ensuite être vérifiée par délétion ou surexpression. Cette approche pourrait ouvrir de nouvelles voies de recherche inexplorées sur les prions de mammifères, notamment dans la mesure ou toute une série de processus ou facteurs anti-prion ont été mis en évidence chez la levure (Wickner *et al*., 2020).

3) Tester la généralité de l'effet de la délétion HTVTTTT dans la PrP de différentes espèces.

La construction de plasmides nécessaires à l'expression de PrP mutante de différentes espèces de mammifères avec la délétion concernée est en cours. Nous pourrions exprimer ces PrP mutantes dans les cellules RK13 ou dans d'autres types cellulaires, les cellules CAD5 délétées de leur PrP endogène qui ont été produites récemment et pourraient être particulièrement intéressantes (Walia *et al*., 2019).

4) Identifier d'autres mutations permettant la formation spontanée de prions en cellule.

Le but serait de trouver une mutation plus compatible avec une conversion de la PrP sauvage par infection dans un deuxième temps. Nous avons fait des microdélétions dans la région 190-196 sans obtenir de prion spontané, mais nous souhaitons tester un certain nombre de mutations ponctuelles comme par exemple H190R qui mimerait la mutation humaine H187R (GSS) et étendre ce type d'exploration à l'ensemble de la séquence de la PrP

Partie 2 :

Infectivité des fibres amyloïdes de PrP ovine recombinante Δ190-196 en culture de cellule.

1. Introduction de la partie 2

Le concept de prion s'applique aux éléments protéiques qui peuvent adopter au moins deux états conformationnels très différents, dont l'un peut induire la conversion de l'autre en lui faisant adopter sa propre structure (Prusiner., 2013 ; Ayers *et al*., 2020). Il s'avère que pour toutes les molécules prions la forme qui permet la conversion présente une structure comprenant de nombreux feuillets beta inter- et/ou intramoléculaires permettant la formation d'oligomères ou de polymères comme des fibres amyloïdes. Plusieurs protéines prions ont été identifiées chez la levure (Aigle *et al*., 1975 ; Wickner *et al*., 2018 ; Coustou *et al*., 1997), un prion existe également chez le champignon filamenteux (Wickner., 1994 ; Maddelein *et al*., 2002 ; Daskalov *et al*., 2021) et un autre a été identifié chez un gastéropode marin (Heinrich et Lindquist., 2011 ; Si *et al*., 2010). Mais l'archétype, celui qui a fait connaître et accepter le concept de prion, est le prion ou plutôt les prions de mammifères liés à la protéine PrP (Prusiner., 1982). Ils ont été découverts parce qu'ils sont responsables de neuropathologies fatales transmissibles (Hsiao *et al*., 1992 ; Mead *et al*., 2019). Les prions induisent très efficacement la conversion de la PrP cellulaire en un nouvel élément prion par simple contact. La multiplication exponentielle de ces structures anormales dans les tissus nerveux provoque le dysfonctionnement et la mort des neurones. L'amplification selon un mode prion de peptides ou protéines mal repliées est aussi responsable d'autres neuropathologies comme la maladie d'Alzheimer ou celle de Parkinson.

La structure a haute résolution des prions est restée méconnue pendant longtemps du fait de leur insolubilité et de leur hétérogénéité. On peut les retrouver sous forme d'oligomères, de dépôts apparemment amorphes dans les tissus du système nerveux central ou dans les cellules en culture mais aussi sous forme de plaques amyloïdes dans le cerveau. Des travaux très récents, encore soumis à publication suggèrent que la structure des prions est en passe d'être résolue

même si de nombreuses questions persistent (Silveira *et al*., 2005 ; Groveman *et al*., 2014 ; Spagnolli *et al*., 2019 ; Baskakov *et al*., 2019). Les prions de même que les fibres amyloïdes de PrP recombinante formées *in vitro* concernent tous deux la conversion d'une PrP avec trois alpha hélice en un assemblage de PrP riche en feuillet beta (Baron *et al*., 2011). Plusieurs travaux ont montré que les fibres amyloïdes synthétiques pouvaient avoir une certaine infectivité dans des modèles de souris transgéniques surexprimant la PrP (Colby *et al*., 2009 ; Muller *et al*., 2014 ; Kraus *et al*., 2017), même si leur activité spécifique prion (unité infectieuse par milligramme de protéine) restait bien inférieure à celle de prions produits *in vivo*. Par contre l'étude structural des fibres recombinante de PrP permettrait de contourner certaines des difficultés rencontrées dans la résolution de la structure des prions, notamment si l'étude concerne des formes mutantes de la PrP. Cependant une certaine hétérogénéité structurale au sein de ces fibres amyloïdes a gêné la résolution de leur structure (Moda *et al*., 2014).

Nous avons montré dans la partie 1 qu'une délétion de sept résidus produisait la conversion spontanée d'une PrP ovine en prion dans un modèle cellulaire. Cela semblait indiquer que le processus de conversion propre à cette protéine était facilité au moins en raison d'une certaine perte de stabilité de la PrP mutante que nous avions également mis en évidence. Nous avons introduit la mutation dans une PrP recombinante produite chez E. coli pour déterminer son effet sur la conversion de la protéine *in vitro* et déterminer la capacité infectieuse des fibres amyloïdes dans le même système cellulaire que précédemment, notamment pour savoir si elles pourraient comme le prion cellulaire spontané induire ou non la conversion du fragment C-terminal mimant la forme C1 de la PrP mutée. L'intérêt de déterminer la structure d'un prion synthétique étant plus attrayante que celle d'une fibre de PrP sans activité biologique démontrée.

2. Résultats de la partie 2

Manuscrit en préparation

Amyloid fibrils of a mutant PrP and its C1-like C-terminal fragment behave like synthetic prions in a cell model.

Djabir Larkem[1], Carola Munoz-Montesino[1#], Joan Torrent[1‡], Sandrine Truchet[1], Mohammed[1] Moudjou, Human Rezaei[1], Vincent Béringue[1], Christina Sizun[2], Michel Dron[1]

[1] Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France
[2] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Université Paris Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France

[#]Present address: Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile
[‡]Present address: MMDN, Univ Montpellier, INSERM, EPHE, INSERM, Montpellier, France; INM, Univ Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France.

Abstract

Prions are beta-sheet rich assemblies of misfolded PrP protein that cause fatal transmissible neurodegenerative diseases in mammals. We recently reported that an ovine PrP with a deletion shortening the H2 alpha helix C-terminus was spontaneously converted to prion in the Rov cell model. We deleted the same 190-HTVTTTT-196 residues from a recombinant PrP (rPrP) produced in E. coli and found that the deletion significantly reduced the nucleation phase for amyloid fibrils (AF) formation *in vitro*. The deletion also conferred fibrils the ability to induce prion conversion of the homologous PrP expressed in cell culture, while AF of wild-type PrP (WT PrP) did not induce transconformation. The protease-resistant core of AF-induced mutant prions consisted of 16-kDa and 14-kDa C-terminal polypeptides. AF of Δ190-196 PrP induced also conformational change of the 14-kDa C-terminal C1-like portion of mutant PrP expressed in RK13 cells in absence of the full-length protein. The 14 kDa polypeptide turned into a protease-resistant C1-like mutant prion self-replicating in cells and de novo infectious. We generated AF with the C-terminal portions of Δ190-196 rPrP mimicking 16-kDa and 14-kDa fragments. These fibrils exhibited synthetic prion activity on cells expressing either the full-length mutant PrP or only its C1-like segment. According to recent structural advances, a beta-sheet is missing in cores of both Δ190-196 rPrP AF and cellular mutant prions, as well as a N-proximal portion of the rigid structure for C1-like AF and prions. This highlights the extent of sequence and structural changes in PrP that are consistent with prion and prion-like polymer formation, providing insight into the ability of PrP to form so many different prion strains.

Introduction

The prion concept applies to proteins or protein elements that are able to adopt at least two very different conformational states, one of which can induce the conversion of the other to its own structure (1,2). In practice it turns out that the converting form of all prions is based on a structural organization with numerous inter- and/or intra- molecular beta-sheets allowing the formation of oligomers or polymer assemblies. Several prion proteins have been identified in yeast (3-5), one in filamentous fungus (6-8) and another has even been identified in a marine gastropod (9,10). But the archetype, the one that made the concept of prions known and accepted, is the mammalian prion linked to the PrP protein (11). Mammalian prions were discovered because they are responsible for transmissible fatal neuropathologies that have the singularity of being both genetic, familial and infectious diseases (12,13). This is because they result from the conformational change of the host protein PrP highly expressed in the central nervous system.

The physiological cellular PrP (PrP^{C}) is a cell surface-anchored glycoprotein with an unstructured N-terminal portion and a globular C-terminal domain consisting of three alpha helices that are stabilized by a short antiparallel beta-sheet and a disulfide bridge connecting the last two helices (14,15). Prions result from misfolding of PrP, which loses its alpha helical content and becomes rich in beta-sheets (16), leading to the formation of molecular assemblies that are insoluble, protease resistant and infectious. The latter are referred to as scrapie PrP (PrP^{Sc}) (17). In humans, PrP misfolding can be either sporadic, with no known cause other than aging, or familial and linked to specific dominant mutations in the coding sequence of the PRPN gene (13). Whether they are or not linked to mutations, prions are thought to emerge through a nucleation and polymerization process that recruits cellular PrP and patterns its structure to conform to that of the expanding polymer. The multiplication of PrP^{Sc} aggregates in the brain induces a dysfunction and the death of neurons (18,19). The remarkable efficiency of conversion and their protease resistance explain why prions can be transmitted by ingestion of contaminated products, contact with contaminated materials in medical procedures or by experimental inoculations to animals. Moreover there are a substantial number of prion strains that may have different biochemical and neuropathological characteristics when propagated in the same congenic line or transgenic mouse line (20-23). It soon became apparent that these different strains reflected more or less important differences in the tertiary and/or quaternary structure of prions. Together with the differences in the primary structure of the PrP of different species and the possible natural or experimental cross-over between some of them, there is in

fact not only one, but very likely a variety of prion structures in mammals (24). Furthermore, the prion-like amplification of misfolded peptides or proteins is also responsible for other neuropathologies such as Alzheimer's or Parkinson's disease. It is therefore important to explore the cellular and molecular mechanisms involved in the emergence of prions and their multiplication. The structure of prions is on the way to being unraveled. Even if questions remain about the size and organization of assemblies linked to infectivity (25-28), the very recent high-resolution structures of recombinant human PrP amyloid fibrils (29) and of a mammalian prion (Kraus, preprint bioRxiv doi: "https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431014") demonstrated a parallel in-register intermolecular beta-sheet architecture for both.

We have been working for some time on the C-terminal region of the second alpha helix (H2). We found out that this protein region, which is located between the two optional glycosylation sites and the two cysteines forming the disulfide bridge, could be modified either by the insertion of eight additional residues or conversely by the deletion of five residues, without preventing efficient prion replication in cell culture (30,31). This was not expected as this region is located inside the structured core of prions. Recently, we have shown that the removal of seven highly conserved residues in this same region (Δ190-196 deletion) apparently reduced the stability of the protein and induced the spontaneous emergence of a new prion with a highly atypical protease resistance profile containing significant amounts of C1-type PK-resistant polypeptides (32). The C1 C-terminal fragment of PrP is present on the cell surface together with the full-length protein and results from the cleavage of the N-terminal part of the protein by cellular metalloproteases (33-35). The C1 polypeptide is shorter than the usual prion protease resistant domains. Since it has never been reported to be converted by any prion, it was considered incapable of being transformed into a prion-like structure (36-38). However we produced cells expressing the mutant C1 without the full-length protein, and showed that infection of these cells with the new spontaneous prion resulted in conversion of the C1 polypeptide into a protease-resistant and transmissible prion entity (32).

Amyloid fibrils (AFs) of recombinant PrP produced in vitro may have some infectivity when inoculated into transgenic mice overexpressing PrP (39,40) or into hamsters (41). However they were not reported to productively infect non transgenic mice with regular physiological levels of PrP, with the exception of amyloid fibrils mimicking the human Y145Stop mutation (42,43). While fibrils might have detectable infectivity when large amounts are injected into mouse brains, the observed attack rates and usually long incubation periods suggest that these fibrils had extremely low titers of specific activity, i.e. infectious units per milligram of misfolded protein, relative to most natural prion strains. However amyloid fibrils may be more amenable

to structural analysis than extractive prions, especially when working with internally deleted mutant prions in the absence of the corresponding transgenic mice. In addition, to our knowledge, only one report showed that some AF preparations may have more or less efficient conversion capacity in cultured cells (44).

We thus have now introduced the seven-residue deletion producing the spontaneous prion into an ovine rPrP and found that corresponding *in vitro* made AFs behaved like synthetic prions, as they induced conversion to prion of the homologous full-length PrP and its C1 fragment in the Rov cell model. We discuss these results in light of recent structural advances (29) (Kraus *et al*. preprint bioRxiv doi: https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431014) strongly suggesting that Δ190-196 deletion removed a region forming an intermolecular beta-sheet in WT amyloids, and thus that we have generated original prion molecules lacking this element in both mutant amyloid fibrils and induced prions.

Results

1- Δ190-196 deletion in PrP facilitates amyloid fibrils formation.

Incubation and shaking of recombinant ovine PrP (25-234) in presence of the chaotropic agent guanidine (final concentration 2 M) induce PrP polymerization into AFs. It is thought that this *in vitro* conformational change process might somehow mimick PrP^C conversion into prions, as rPrP amyloid fibrils were shown to be infectious in laboratory rodents and in cell culture (44,45). Previously, we reported that Δ190-196 deletion truncated H2 helix C-terminus and reduced PrP stability, leading to the spontaneous formation of a prion when expressed in cell culture (32). Using a fluorescent thermal shift assay, we also found a significant decrease in the melting temperature of recombinant Δ190-196 PrP compared to WT PrP, pointing to reduced stability (32). We confirmed here by differential scanning calorimetry that the melting temperature of Δ190-196 deletion mutants was decreased by 4-5°C, both for the full-length PrP and the C1 fragment (residues 113-234) (Table 1). Despite removal of residues in a region that forms the beta sheet core of the misfolded protein (46,47), Δ190-196 rPrP effectively formed amyloid structures during incubation and shaking in the presence of guanidine, as shown by ThT binding and by visualization by electron microscopy or Atomic Force Microscopy (AFM) (Fig. 1). Kinetically, ThT positive Δ190-196 PrP polymers appeared systematically sooner than WT PrP (Fig. 1A). Accordingly, the lag phase/nucleation phase of the reaction in multi-well plates was significantly reduced for Δ190-196 PrP compared to WT PrP (Fig. 1B and supplemental Fig. S1). In addition, under standard conditions of amyloid production in tubes,

Δ190-196 PrP was still able to polymerize into AFs when orbital agitation was omitted (Fig. 1D), whereas WT PrP was no longer able to do so.

EM and AFM images of Δ190-196 amyloids were compatible with assembly of intertwined protofibrils (Fig. 1, C and D), as recently reported for human rPrP by cryo-EM (29). AFM images also indicated that the positively charged unstructured N-terminal part of the protein remained outside the central beta-sheet core of the amyloid (supplemental Fig. S2 and Fig. 1D). Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectra were recorded for WT PrP and Δ190-196 PrP fibrils to get further insight into their structural properties (Fig. 2A). The SRCD spectra of WT and Δ190-196 PrP fibrils show similar features and are comparable to that of spontaneously generated ovine rPrP (25-233) fibrils (40). The values for the minimum and maximum at 217 and 194 nm strongly remind of the signature of the β-solenoid structure of Aβ42 fibrils (Fig. 2A). Hypsochromic shifts of 2 nm for the minimum and 3 nm for the transition wavelength between negative and positive MRE, observed for Δ190-196 PrP fibrils versus WT, point to slight differences between WT and Δ190-196 structural organization. Deconvolution of the spectra of WT and Δ190-196 (Fig. S3) by BestSel (48) is compatible with the presence of the large disordered N-terminal tail of PrP and the length of the amyloid core in the 3D structures of in vitro formed rPrP AFs (29).

For a biochemical comparison, WT PrP and Δ190-196 PrP AFs were digested with PK in standard or "annealing" conditions (Fig. 2B). In the latter condition, adding triton X100 and increasing steadily the temperature up to 80°C modified the PK-resistant pattern of mouse PrP AFs (49). It increased the proportion of a fragment migrating at the same size (16-kDa) as the highly PK resistant C2 core of prions (50). In both conditions, WT PrP and Δ190-196 PrP AF showed related PK-resistant patterns (Fig. 2B). Yet, in addition to the slight mobility shift due to the Δ190-196 deletion, mutant PrP AF pattern was enriched in 10-kDa band and depleted in 6-kDa band.

Taken together, these results indicate that the C-terminal end of the H2 helix was not necessary for structuring PrP into amyloid fibrils. On the contrary, deletion of this region facilitated AF formation by shortening the nucleation phase/lag phase of the reaction. The higher propension of Δ190-196 PrP to form AFs would be consistent with the spontaneous prion conversion of Δ190-196 PrP^{C} in RK13 cells (32) on (Table1). Slight but significant modulations in CD spectra and PK-resistant patterns were also observed, potentially pointing to structural differences between WT and mutant fibrils.

2- Amyloid fibrils from Δ190-196 rPrP induce conformational change of Δ190-196 PrP^C into PrP^{res} in RK13 cells.

We previously reported that Δ190-196 PrP^C expressed in RK13 cells spontaneously formed a prion, with an atypical PrP^{Sc} signature, which we termed Δ^{Spont} prion (32). During the course of these experiments, we isolated a particular cell clone (clone 12) that did not produce Δ^{Spont} prions even after one year of culture, despite expression of mutant PrP at a level comparable to that of other Δ190-196 PrP expressing cells and proper delivery of the protein to the cell surface (32) (Fig. S3). Clone 12 was susceptible to Δ^{Spont} prion infection and was therefore suitable to test the infectious potential of amyloid fibrils from Δ190-196 rPrP.

Clone 12 was exposed to AFs from Δ190-196 rPrP (2.2 μM final concentration) for 3 days, before being washed and passaged as routinely done during our infection protocols with PrP-expressing RK13 cells (32). As controls, this clone was exposed to WT PrP AF or the monomeric alpha helical form of recombinant Δ190-196 PrP. We checked for the appearance of PK-resistant forms over passage. AF from Δ190-196 rPrP consistently induced the conversion of the homologous PrP^C to a protease-resistant state (Fig. 3A). In contrast, Δ190-196 PrP^C remained sensitive to protease digestion when clone 12 cells were incubated with either the WT PrP AF or with monomeric Δ190-196 rPrP (Fig. 3A). PrP^{res} neosynthesis induced by Δ190-196 AF was maintained over cell passaging (Fig. 3B), consistent with a well-established characteristic of prions propagating in cell culture.

To consolidate the finding that Δ190-196 rPrP AF transconformed Δ190-196 PrP^C, we varied the cell exposure conditions. The time of contact was varied, from 18h to 5 days, without detrimental effect on the capacity of the AF to transconform PrP^C into PrP^{res} (Fig. 3C). The dose of exposure was also varied. Δ190-196 rPrP AF still had converting activity at a concentration equivalent to 0.07 μM of PrP (Fig. 3D). Shortening AF size by sonication marginally affected the conversion efficiency when used at 1μM or 2μM of PrP equivalent (Fig. 3E). Finally, Δ190-196 PrP AF could convert Δ190-196 PrP^C from another rare and recently isolated independent clone of Δ190-196 Rov cells that was resistant, like clone 12, to spontaneous prion production over eight months of continuous culture (Fig. 3G).

The capacity of Δ190-196 AF to convert WT ovine PrP^C was tested in two independent RK13 cell clones termed Rov9 and P2FJ6 clones, both being known to be highly susceptible to several ovine prion strains (22,51). Δ190-196 PrP AF was not able to convert WT PrP^C (Fig. 3F). The absence of the seven contiguous residues in the fibrils could explain such inability, just as spontaneous Δ190-196 prions were unable to convert WT PrP in our previous work (32).

Altogether, these results showed that the Δ190-196 AF produced *in vitro* specifically induced the conversion of the homologous highly-glycosylated mutant PrP expressed in cells to an insoluble and aggregated protease-resistant state.

3- **Biochemical properties of PrP^{res} in Rov cells exposed to Δ190-196 amyloids.**

We next tested whether different batches of Δ190-196 AF would induce production of PrP^{res} polymorphs in clone 12 cells (52). More than ten independent batches of Δ190-196 PrP AF were produced; all induced the formation of PrP^{res} following incubation with Rov cells of clone 12 (Fig. 4A). The obtained PrP^{res} electrophoretic profile showed a predominance of glycosylated species from 18-kDa to 35-kDa and two unglycosylated bands of lower intensity at 14-kDa and 15.5-kDa, the later one being referred as the 16-kDa band (Fig. 4A). The proportion of unglycosylated PrP species was rather low, most likely because Δ190-196 PrP is highly glycosylated in Rov cells (Fig. S3).

After deglycosylation by PNGase treatment, the whole Δ190-196 PrP^{res} signal was resolved in the two 14-kDa and 16-kDa polypeptides (Fig. 4A). The protease-resistant polypeptides were C-terminal fragments of PrP as shown by revelation of immunoblots with the C-terminal anti-PrP monoclonal antibody F99 (Fig. 4B). The two PrP^{res} polypeptides induced by AF had the same size as the two major bands from Δ^{Spont} prions (32) but the amounts produced were generally much lower (Fig. 4C). We also noticed a marked difference in the relative representation of the two bands depending on the batch of amyloid fibril used to infect cells (Fig. 4B).

The relative concentration of the two 14-kDa and 16-kDa polypeptides varied amongst the AF preparations used for cell incubation. In most cases, the 14-kDa band that matched the size of the C1 fragment of Δ190-196 mutant PrP (32) was predominant. In contrast, for two independent batches of fibrils, the 16-kDa PrP^{res} band was more abundant than the 14-kDa band (Fig. 4A). This 16-kDa-enriched PrP^{res} profile was reproduced in eight independent experiments with the same batch (Fig. 4A, lane 3 and Fig. 5A). The 16-kDa > 14-kDa ratio was not observed for the spontaneous Δ^{Spont} prion or for clone 12 cells infected by this mutant prion (Fig. 4C).

Previously, we reported that in Δ^{Spont} prions the 16-kDa band resulted from protease digestion of full-length Δ190-196 PrP^{Sc}, while the 14-kDa band resulted either or both from digestion of full-length PrP^{Sc} or direct conversion of the natural Δ190-196 C1 fragment (32). The two PrP^{res} species resisted to high PK concentration and maintained their relative proportions after harsh PK treatment (Fig. 4D and 5B).

Fig. 5C highlights the fact that, in the same experiment, cells inoculated with independent batches of AF could produce different PrP^{res} profiles and that the ratio of non-glycosylated bands was maintained over cell culture passages. This suggested replication of different prion strains in cell culture with the classic and well documented maintenance of specific PrP^{res} profiles.

4- **Synthetic beta sheet polymers of PrP induced formation of cellular prions.**

The infectious potential of AF-induced Δ190-196 PrP^{res} was tested by cell assay using Δ190-196 clone 12 Rov cells. Cells from clone 12 were challenged with AF or left uninfected. As a control, RK13 cells devoid of PrP were challenged with the same batch of AF (Fig. 6A). The cells were cultivated and split for five passages before being used to inoculate *de novo* naïve clone 12 cells. Only cell lysate from AF-infected clone 12 Rov was infectious (Fig. 6A). Absence of infection with uninfected control sample excluded a possible non-specific effect of the cell lysate. Absence of infection with the lysate from infected RK13 cells indicated that after five passages of the culture there was no more, or at least not enough remanent material from the input AF to induce a productive infection in clone 12 cells. In a second experiment we used another independent cell lysate of Rov cell clone 12 inoculated with AF and confirmed infectivity of Δ190-196 PrP^{Sc} (Fig. 6B).

Altogether these results demonstrated that AF induced the emergence of true transmissible prion entities. Strikingly, the different PrP^{res} profiles in the inocula with respect to 16-kDa versus 14-kDa ratio were conserved upon clone 12 infection . This preservation of distinct biochemical characteristics of PrP^{Sc} was reminiscent of the specificity of prion strains, an appealing hypothesis that should be confirmed by further infection experiments.

5- Δ190-196 amyloids convert the $C1_{113}$ portion of Δ190-196 PrP expressed in Rov cells

AF infections of clone 12 produced a 14-kDa PrP^{res} polypeptide with a size similar to C1. Previously, we showed that Δ190-196 Δ^{Spont} prions propagate in RK13 cells expressing only the C1 fragment of Δ190-196 PrP^{C} (32).We thus examined whether amyloid fibrils could also specifically convert the C-terminal region (113-234) of the mutant PrP. Of note, this cell model of mutant C1 expression does not produced spontaneously a C1 prion and was thus fully suitable to test AF infectivity. AF from full length recombinant Δ190-196 PrP were infectious and induced production of a protease-resistant form of Δ190-196 $C1_{113}$ that was maintained over cell passaging. AF produced with WT PrP were not infectious in this cell line (Fig. 7A).

We further tested the infectivity of this AF-induced self-propagating Δ190-196 $C1_{113}$ insoluble, aggregative and protease-resistant form on Rov cells clone12. Cells infected by the misfolded form of the mutant C1 produced PrP^{res} (Fig. 7B). The PrP^{res} profile exhibited the 16-kDa and 14-kDA unglycosylated bands (Fig. 7B) as for Rov cells clone12 infected by *in vitro* made AF or by the cellular prion induced by them (Fig. 6). These results established that misfolded conformers of C1 PrP induced by incubation of cells with AF were true self-replicating and transmissible prion entities.

Of note, clone 12 cells expressed the full length mutant PrP and thus produced its natural C1 fragment by cellular processing. The presence of the 16-kDa PrP^{res} band in clone 12 infected by C1-like PrP^{Sc} implies that the full-length mutant protein and not only its C1 fragment was converted into a protease-resistant state. This conversion of the full-length protein might result either or both from direct contact by the infecting C1-like PrP^{Sc} or from previous conversion of the true endogenous C1 fragment that in turn had induced conversion of the full length protein.

6- **The N-terminal (25-102) part of the mutant PrP is not required for AF infectivity.**

The amino-proximal segment of PrP is not necessary for prion conversion since the protease-resistant cores starts around residues 85 or 100 for type 1 or type 2 sheep prion strains, respectively and in or just downstream residues 101-105 for the 16-kDa Δ^{Spont} polypeptide (32). We knew from our previous NMR spectroscopy investigations that the 25-102 deletion removed a large part of the flexible N-terminal moiety of the PrP without affecting the globular alpha helical structure of the recombinant ovine PrP, including mutants with H2 C-terminal truncation (31). Here, AFM observations suggested that at least a large part of the N-terminal tail of the full length Δ190-196 PrP remained outside the amyloid core of AF (Fig. S2). The N-terminal part of PrP may thus be dispensable to amyloid fibrils infectivity. The N-terminal deletion did not impair formation of ThT positive AF made from the double mutant rPrP (Δ25-102, Δ190-196) as shown by EM observation (Fig. 8A). In our Rov cell assays expressing either the cellular mutant PrP in clone 12 N-terminally deleted Δ190-196 AF induced PrP^{res} accumulation with specific presence of 16-kDa and 14-kDa fragments (Fig. 8B). AF of the double mutant PrP also induced conformational change of the Δ190-196 $C1_{113}$ fragment to a self-propagating protease-resistant state (Fig. 8B). Thus, these data indicate that the N-terminus of recombinant PrP is not essential for synthetic prion-inducing activity.

7- AF of recombinant C1-like portion of PrP induced prion conversion of the cellular homolog.

As AF of full-length protein induced the formation of a $C1_{113}$ prion in cell culture (Fig. 7), we finally asked whether AF from the same C-terminal part of the recombinant protein could convert the homologous PrP segment in cells. AF of 113-234 C1-like PrP with the Δ190-196 specific deletion were produced in similar conditions as full length PrP (Fig. 9A). Exposure of clone 12 cells (Fig. 9B) or $C1_{113}$ Δ190-196 Rov cells to the produced AF led to persistent accumulation of highly glycosylated C1-like PrP^{res} as soon as the second passage and up to passage 10 at which time the experiment was stopped. A lysate of cells propagating the $C1_{113}$ PrP^{Sc} prepared passage 9 to avoid residual AF material was used as inoculum to challenge naïve $C1_{113}$ Δ190-196 Rov cells. These *de novo* infected cells in turn produced $C1_{113}$ PrP^{Sc} in subsequent passages of cell cultures, while controls remained negatives (Fig. 9C).

Altogether these results showed that a C1-like segment of ovine PrP with the Δ190-196 internal deletion was sufficient to generate both a synthetic prion with an amyloid core *in vitro* and a transmissible prion entity in living cells.

Discussion

We previously reported that expressing PrP^{C} with a Δ190-196 deletion in helix H2 leads to spontaneous prion formation in cell culture (32). In the present study, we showed that the introduction of the same deletion in recombinant PrP allows the formation *in vitro* of amyloid fibrils that behave like synthetic prions as they induced the cell conversion into protease-resistant and transmissible prion entity both the homologous Δ190-196 PrP and its C-terminal C1-like part.

Deletion of residues 190 to 196 in recombinant PrP favored amyloid fibrils formation *in vitro*. The nucleation phase prior to the appearance of ThT positive AF was shorter for mutant PrP than for WT. It is tempting to link this increased capacity of mutant PrP to form beta-sheet rich nuclei *in vitro* to its propensity to spontaneously form prions in cell culture. In both cases, the significant loss of stability of the monomeric protein due to deletion could be an important element to reduce the level of activation energy required for the conversion process and facilitating conformational change between the two states of the protein and the nucleation. This decrease in stability could produce a significant increase of partially denatured forms, which are considered to be the most susceptible for the initiation of PrP AF *in vitro* (53).

Alternatively, the deletion might also increase the stability of the nuclei or polymers of the mutant PrP compared to that of the WT protein.

To test the infectious potential of AF from recombinant Δ190-196 PrP, we used a cell assay based on two sublines of Rov cells that do not produce spontaneously prions, even after months of culture. We showed that AFΔ induced the conversion of the cellular mutant PrP towards its PK-resistant state both in a cell clone expressing the homologous mutant PrP and in a cell population that expressed only the C1 part of Δ190-196 PrP. In contrast the incubation of these same cells with WT AF did not induce the conversion of either the mutant PrP or its C1 fragment, indicating that a contact of cells with any kind of amyloid assemblies is not sufficient to induce the conversion of the mutant PrP or of its C1 fragment. These data suggest instead that some sequence or structural compatibility between the infecting fibrils and the cellular PrP is required for the conversion. Accordingly, Δ190-196 AFs were unable to induce the conversion of the WT PrP expressed in cellular clones known to be highly susceptible to prion infection. This inefficacy was not unexpected as the spontaneous Δ190-196 mutant prion was also unable to propagate on WT PrP expressing cells (32). The loss of seven contiguous residues that are part of the globular domain of PrP^{C} and of the core beta sheet of prions is expected to lead to significant structural changes. Such a lack of compatibility between wild-type and mutant PrP is somewhat reminiscent of the transmission barrier observed in interspecies transmission of prions (24). However, WT AFs were also unable to convert the WT PrP into prion, indicating that sequence similarity alone is not sufficient to confer AFs the capacity to convert the homologous PrP in cell culture. According to the conformational selection hypothesis, WT AF structure may not be in the PrP^{Sc} folding landscape of WT PrP^{C}. Alternatively, the specific property of Δ190-196 AF to convert Δ190-196 PrP could be related to the reduced stability of the mutant protein, which could facilitate conformational exchange.

Cells exposed to Δ190-196 PrP AF produced a mutant PrP^{Sc} harboring the typical biochemical and biological characteristics of a prion: protease resistance, insolubility and infectivity, since the misfolded form could be transmitted by infection to naive cells. Many independent experiments were performed with different batches of mutant PrP AF and all resulted in the infection of the cells, with accumulation of PrP^{res}, albeit at lower levels than with classical prions or Δ^{spont} or prions. The electrophoretic pattern of PrP^{res} that accumulated in the infected cells was to similar to that of Δ^{spont} prions with the unglycosylated forms migrating at 16-kDa and at 14-kDa, like the C1 PrP^{res} fragment. Depending on the batch used, a different

ratio of 16-kDa PrP^{res} versus 14-kDa was found. These different ratios were faithfully maintained when naïve cells were further infected. Whether these are associated with different strains of mutant prions deserves further investigation. We may extrapolate that the 16-kDa band results from truncation of full-length PrP^{Sc}, while the14-kDa protease-resistant polypeptide could result either or both from extended trimming of the full-length PrP^{Sc} or from direct conversion of the natural C1 fragment of the mutant PrP. Thus the differing ratios between the 16-kDa and 14-kDA bands could reflect either a change in the preferred substrate for the conversion (full length versus C1), or a different sensitivity of PrP^{Sc} to protease digestion. These two possibilities fit with induction of slightly different strains of mutant prions by amyloid fibrils.

The N-Terminal moiety is unstructured in PrP^{C} and remains sensitive to protease digestion once conversion into PrP^{Sc} has occurred. Prion infectious protease-resistant core called C2 fragment corresponds to the C-terminal part starting around residues 85 to 100 for ovine prions depending on the strain. C2 was shown to be sufficient for prion propagation in transgenic mice (36). We showed here that AF produced by a recombinant Δ190-196 PrP deleted from its N-terminus up to residue 102 still efficiently induced the conversion of the full-length and the $C1_{113}$ fragment of Δ190-196 PrP. Thus as for natural prions, the unstructured N-terminal part is not required for the infectivity of the synthetic prion structure contained in AF.

The C1 fragment from PrP results from the cleavage of the N-terminal part of the protein by metalloproteases and this C-terminal moiety of PrP is anchored at the cell surface as the full length protein. The natural C1 PrP^{C} fragment is considered too short to be converted into PrP^{Sc} according to experiments in which gradually N-terminally truncated PrP or the C1 fragment alone were expressed in transgenic mice (36,38). Indeed, in the vast majority of cases the size of the PK resistant polypeptide is larger than that of the C1. A particularity of the Δ190-196 Rov cell model was its capacity to make C1-like PrP^{Sc} entities emerged. The proven existence of such an amazing protease resistant structure was first described following infection of Δ190-196 C1 Rov cells by the Δ^{Spont} prion (32). We showed here that the same was true after infections by AF generated either by the full-length Δ190-196 recombinant PrP protein, its N-terminally truncated version or its (113-234) C-terminal portion only.

The high-resolution structure of PrP^{Sc} from 263K prions has very recently been solved by cryo-EM (Kraus *et al.* preprint bioRxiv doi: https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431014).

That of recombinant human PrP amyloid fibrils, whose infectious potential has not been established, but was probably very weakly or not infectious was published just before (29). These resolved structures have both parallel in-register beta sheet (PIRIBS) architectures. Even if they showed important differences, the AFs are constituted by the symmetrical winding of two protofibrils, whereas the prion fibril corresponds to the stacking of similar beta sheet molecules into only one protofibril. Regarding the region, which was deleted in our Δ190-196 mutants, the data are quite similar in both cases: the deleted sequence (HTVTTTT) contains a beta-strand TVTT (beta9) for 263K PrP^{Sc} or TVTTT (beta3) for the AF (29). The region is isolated in the beta-arch formed by the disulfide bridge in both cases and, being located on the outside, does not seem to interact with other parts of the molecule. This stretch of residues is thus integral part of the rigid structure and not relegated to a loop. The Δ190-196 deletion is thus expected to create a perturbation in the assembly of PrP into fibrils. However the position of this stretch within the fibril structures is compatible with partial conservation of the fibril core structure. The position of the stretch of the seven residues seems thus compatible with generation of a new kind of mutant prion upon deletion and with formation of AF associated with specific properties. The structure of the full PK-resistant C2 amyloid core of the 263K hamster PrP^{Sc} was resolved and showed that the region of 15 residues upstream to the hamster C1 start point contains only two small intermolecular beta sheets and is also located toward the outside of the structure, a situation a priori compatible with formation of a reduced C1 core maintaining the main hydrophobic region (equivalent to 115-139 in ovine PrP) that formed a "Greek key" like motif in 263K prion. On the other hand, the structure of Δ190-196 C1 core might significantly differ from that of more usual prions.

In conclusion, ovine WT rPrP amyloid fibrils made *in vitro* have not shown infectivity in Rov cell cultures to date, but a specific deletion in the structured part of the protein leads to the formation of amyloid fibrils which can induce prion conversion of the homologous mutant protein expressed in cells. This deserves further work to establish the structure of these AF synthetic prions, since i) the Δ190-196 deletion removed residues included in the beta amyloid core, four of these residues being associated with genetic cases of human prion disease ii) the induced prions are unconventional iii) an unusually short C-terminal portion of the protein akin to C1 generates prion-like structures.

Materials and methods

Plasmid constructs for cell expression

For plamids used to transfect cells the sheep Prnp ORF encoding PrP allotype VRQ (Val136, Arg154, and Gln171) was cloned into pTRE plasmid of the pTeT-on expression system (Clontech) (51). Deletion of residues HTVTTTT (positions 190–196) and deletion Δ25–112 to generate Δ190-196 $C1_{113}$ PrP segment were performed by site-directed mutagenesis (QuikChange II mutagenesis kit; Stratagene) as previously described (31,32,54)). Each mutant construct was verified by sequencing.

Plasmid constructs for bacterial expression

The ovine PrP (residues 25-234, allele VRQ) was previously cloned into the bacterial expression vector pET22(+) (Invitrogen) (55) .The Δ190-196 deletion was performed by site-directed mutagenesis to produce the full-length Δ190-196 mutant protein. To produce the N-terminally-deleted double mutant PrP (Δ25-102, Δ190-196), the Δ190-196 deletion was done in the sequence of the 103-235 portion of sheep PrP previously cloned downstream of a His Tag into the pET28 (Invitrogen) expression plasmid. A third deletion Δ103-Δ112 was also done in the later construct to generate the Δ190-196 $C1_{113}$ polypeptide described previously (32). The PrP sequence was verified by sequencing for all constructs.

Antibodies

The anti-PrP mAbs used were as follows: 4F2 directed to the octa-repeat domain (residues 62–94) according to sheep PrP numbering (56,57) Sha31 (residues 148–155) (56) (Bertin Pharma), and F99/97.6.1 (residues 224–234) (58,59) (VMRD, USA). Sha31was biotinylated and further detected with horseradish peroxidase–conjugated streptavidin. For other mAbs, secondary antibodies were peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Abliance) used at 1:5000.

Cell culture and isolation of rov cells

Rov cells are RK13 epithelial cells that stably express either WT or mutant ovine PrP in an inducible manner, using a tetracycline-inducible system (51). They were obtained by transfection of cells with lipofectamine and selection with puromycin. We used cell populations produced by a pool of puromycin-resistant cells, unless otherwise indicated. Population of Rov cells expressing the $C1_{113}$ polypeptide have been described previously (32).We also used clone

12 of Rov Δ190-196 cells that was described previously and was obtained by serial dilution of transfected cells in the presence of the selecting agent (32). Cells were grown in Opti-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics and split 1:4 after trypsin dissociation once a week. To express full-length PrP^{C} or C-terminal polypeptide $C1_{113}$, cells were cultured in the continuous presence of 1µg/ml doxycycline (Sigma).

Amyloid fibril (AF) infection test

Cells were seeded in 24-well plates in presence of 1µg/ml of doxycycline for two or three days and tested with AF when they reached approximately 80% confluence. Fresh medium containing AF at 2µM unless otherwise indicated and gentamycin (60µg/ml) was added to the cells for three days, after which cells were washed with phosphate buffer saline (Gibco), trypsinized and resuspended in fresh medium in a flask at a 1:10 dilution. The cells were then passaged weekly.

Infection test of AF-induced PrP^{Sc}

To test the infectivity of cell cultures, cells were pelleted, frozen and thawed three times and sonicated three times for 30 s and the resulting homogenates were used as inocula to infect naive cell cultures as previously described (30,60). Homogenates were left for 3 days on the infected cells. They were then washed with PBS, trypsinized, and seeded at a 1:10 dilution in fresh culture medium. The cells were then split at a 1:4 dilution after 1 week of culture as for each other successive passage.

Δ^{Spont} Prion and prion infection

The spontaneous mutant prion Δ^{Spont} was previousy characterized (32) and was propagated on Δ190-196 Rov cells. For infection by ΔSpont prion, homogenates of Δ190–196 Rov cells harvested at passage 11 after the addition of doxycycline were used to infect Δ190–196 clone 12 (Fig. 4C) as described (32).

Cell lysis, protease digestion, and PNGase F treatment

Cells were washed twice with cold PBS, and cell lysates were prepared in TL1 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Triton X-100). Lysates were clarified by centrifugation for 2 minutes at 800 x g, and the protein concentration determined by microBCA assay (Pierce). To test for the presence of PrP^{res}, lysates were incubated with 10 µg of PK per 1 mg of protein for 2 h at 37 °C, then centrifuged for 30 min at 22,000 x g. Pellets were obtained

at the bottom of the tube for all samples, regardless of whether the cells were infected or not and whether they contained PrP^{res}. These pellets were dissolved in Laemmli sample buffer and boiled for 15 min at 110 °C. When required, 500units of PNGase F (New England BioLabs) and 1% Nonidet P-40 were added to the denatured proteins, which were then incubated under agitation at 30 °C overnight.

Immunoblotting and detection of PrP^{C} and PrP^{res}

Criterion XT Bis-Tris 12% gels (Bio-Rad) were used for SDS-PAGE. For PrP^{C} analysis, 50 µg of protein per sample was loaded onto the gel. For PrP^{res} detection, unless otherwise specified, samples corresponding to PK-resistant PrP contained in 250 µg of protein from cell lysates were loaded onto the gel. Protein transfer, detection, and revelation have been described previously (54,61).

Immunofluorescence, image acquisition, and treatment

Cells were grown on plastic dishes or glass coverslips in plain medium and washed twice with PBS before being fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde. Cells were then washed and incubated with 4F2 monoclonal primary antibody at 1:5000 in blocking reagent buffer containing 0.5% crystalline (Roche Diagnostic) and 0.1% Tween 20 in PBS. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) used at a dilution of 1:500, as previously reported (54,62), and nuclei were stained with 49,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were acquired with an Axio observer Z1 microscope (Zeiss) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and driven by the Axio-vision imaging system software. For some experiments, confocal microscopy was performed with a Zeiss LSM 700 microscope (Plateforme MIMA2, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France) using a Plan-Neofluar 403 (NA1.3) or Plan-Apochromat 633 (NA 1.4) oil immersion objective. Images were analyzed using ImageJ software version 1.49 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, RRID:SCR_003070).

Expression and purification of recombinant PrP

Recombinant WT and mutant PrP were produced and purified from Escherichia coli BL21 (DE3) as previously described (31,32). Briefly, transformed E. coli were incubated in LB medium and protein expression was induced by 1 µM of isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) induction. After overnight incubation, bacteria were centrifuged, resuspended in Tris-EDTA

buffer containing Triton, incubated at 37°C and then sonicated on ice and centrifuged again to recover inclusion bodies. Pellets were resuspended for at least 24H under rotation in a binding solution containing Gnd-HCL at the concentration of 6M and imidazole 2.5mM. The suspension was recovered and clarified by centrifugation. Recombinant PrP was isolated by affinity chromatography on Nickel column and elution by imidazole. Refolding of the protein was achieved on the column by heterogeneous phase renaturation simultaneously with purification. Purified PrP was recovered in ammonium acetate buffer buffer (0.5g/l, pH 4.6) by elution through a G25 desalting column. The final protein concentration was measured by absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of 59485 $M^{-1}cm^{-1}$ for full length protein (25-234), 18005 $M^{-1}cm^{-1}$ for N-terminally deleted PrP (103-234) and for $C1_{113}$ (113-234). Proteins were checked for purity by SDS-PAGE with coomassie blue staining and were then lyophilized for long-term storage at -80°C.

Formation of amyloid fibrils

Amyloid fibrils were formed according to previously described procedures (63,64). Briefly to form amyloid fibrils, PrP stock solutions were prepared by resuspending lyophilized PrP in 50 mM MES, pH 6.0 and 2 M GdHCl usually at concentration of 22µM. Typically fibrillation reactions were performed in 15 ml conical plastic tubes in a total reaction volume of 8ml, the tube arranged horizontally on the plate surface was incubated with continuous orbital shaking of 16 mm amplitude at 30 r.p.m. and 30°C. Fibril formation was monitored using a thioflavin T (ThT) binding assay (64). For this assay, aliquots were withdrawn and diluted into 10 mM Na-acetate buffer, pH 5.0 to a final concentration of PrP of 0.3 µM and ThT was added to a final concentration of 10 µM. ThT fluorescence emission spectra were recorded after excitation at 450 nm as previously described (63). To stop the reaction Fibrils were put on ice and dialyzed in 10 mM sodium acetate pH 5.0 at 4°C. Then fibrils were collected by ultracentrifugation for 45 min a Beckman Optima TL100 Ultracentrifuge and TLA-100.3 rotor, and resuspended in 10 mM sodium acetate, pH 5.0. All concentrations given for fibrillar PrP refer to the respective equivalent monomer concentration.

Fibrillation Kinetics (semi-automated assay). The kinetics of PrP amyloid fribril formation were probed using a microplate reader (SAFAS Xenius XML) coupled to the standard ThT-based fluorescence assay (ThT final concentration of 10 µM). 96-well black microplates were used. The reaction was 100 µl per well at the indicate concentration (Fig1B) or 22µM PrP equivalent (Fig.S1). Kinetic experiments were carried out at 33 °C under agitation, in the same

buffer than previously for tests in tubes. We performed intermittent shaking cycles, consisting of 1 min of shaking at 600 r.p.m. followed by a 30 second incubation break. In order to assess reproducibility of kinetics, 5 microplate wells were filled with each sample for simultaneous measurements in Fig. 1B and 4 wells for each sample in Fig. S1. Fluorescence emission of ThT were recorded every 30min at 490 nm after excitation at 450 nm. The initial fluorescence, measured in tubes and in microplates, was subtracted from each data point. ThT fluorescence curves as a function of time were fitted to a sigmoid function ($A/(1+\exp(-(t-t_{1/2})/\tau)$). Lag times were determined as $t_{1/2}-2*\tau$.

Annealing of fibrils and proteinase K digestion assay. For annealing (also called maturation) of fibrils, 100µl of PrP fibrils at concentration of 10µM in of Tris-HCl buffer, pH 7.4 at 10mM and Triton X-100 at 1% were placed in a PCR tube and submitted to the temperature program: (20°C 1 min – 5 cycles (80°C 1 min - 37°C 1 min) – 15°C 30 min). Then fibrils were treated with proteinase K to PK/PrP ratio of 1:215 at 37°C for half an hour. Digestion was stopped by adding PMSF. Samples were heated at 95°C for 10 min and analyzed on 12% SDS-PAGE gels (Criterion XT precast gel, BioRad).

Transmission Electron Microscopy. Samples were deposited onto Formwar/Carbon Coated grids, negatively stained with freshly filtered 2% uranyl acetate, dried and viewed in a JEOL 1200EX2 electron microscope (JEOL USA, Inc, Peabody, USA).

Atomic Force Microscopy- For all experiments samples were diluted to 1µM in10 mM Sodium acetate buffer, pH 5.0). Next, 50 µl of the diluted sample were deposited on a freshly-cut mica surface (MICA, structure probe INC., US) glued to a microscope slide at room temperature on the bench until dry. After five minutes the surface was washed and immersed in the same buffer for analysis. Force images were acquired on a NanoWizard-IV AFM (JPK Instruments AG, GER) in standard QI-mode using a mini cantilever Bruker Peakforce-HIRS-F-B silicon Tip; spring constant: 0.09 N/m, resonance frequency: 25 kHz. Images were treated by one polynomial line fit and a histogram line fit using the data processing software of the AFM (JPK data processing, Version spm-6.1.59, JPK Instruments AG, GER).

Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Calorimetric unfolding thermograms of WT and Δ190-196 mutant sheep VRQ PrP were obtained at pH 4.5 in 20mM Sodium acetate buffer pH 4.6 for which folding/unfolding processes was reversible (65). Measures were performed on a DSC instrument (MicroCal), and experiments performed at 45 µM protein concentration in a 800 µl cell. An external pressure of 34 psi was applied on the solution and, the scan rate was 60° C/hour. The thermodynamic parameters were determined and reported in table 1.

Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD)

SRCD experiments were performed on the DISCO beam line (proposal 20201028) of the SOLEIL synchrotron (Saint Aubin, France). 4 µL of fibril samples at ~2 mg/mL protein concentration in 10 mM Na acetate pH 5.0 buffer were deposited in a CaF2 cell with a 59 µm path length. Measurements were done with a 1 nm spectral resolution at a temperature of 25°C, with 3 and 5 scans for protein and buffer samples, respectively. Smoothing, baseline subtraction, offset correction and intensity calibration with CSA (6.53 mg/mL concentration and 0.1 mm path length) were carried out with the CDToolX software (66). Intensities were converted from θ (mdeg) to mean residue ellipticity (MRE, $deg.cm^2.dmol^{-1}$). Protein concentrations were determined from the absorbance at 280 nm.

Table 1. Analysis of recombinant PrP by Differential Scanning Calorimetry.

	Tm (°C)	ΔCp (kJ $mol^{-1}K^{-1}$)	ΔH (kJ/ mol)	ΔS (kJ/ mol)	ΔG^0 (kJ/ mol)
FL WT PrP	70.3	0.98	308	0.89	42.8
FL Δ190-196 PrP	65.6	0.66	245	0.72	30.4
$C1_{113}$ WT PrP	62.0	1.05	312	0.93	34.9
$C1_{113}$ Δ190-196 PrP	58.0	0.70	238	0.71	26.0

The melting temperature and others thermodynamic parameters of the full length WT ovine rPrP (FL WT) or only its C-terminal (113-234) C1-like portion ($C1_{113}$ WT) and of mutant counterparts (FL Δ190-196) and ($C1_{113}$ Δ190-196) were determined by DSC at pH 4.5 (65). The Tm was reduced by 4.7°C for the full-length mutant protein and by 4°C for the C1 segment. The Δ190-196 deletion leads to significant reduction in stability of the protein in agreement with fluorescent thermal shift assays previously reported (32).

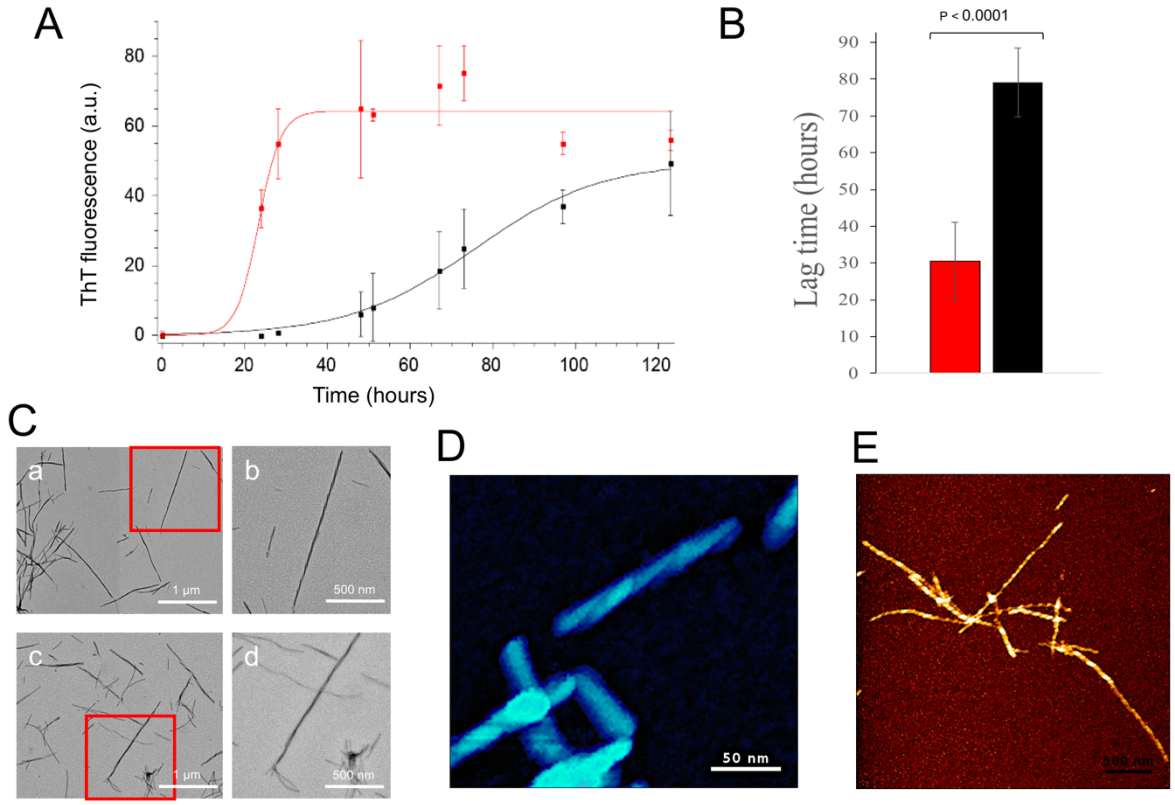

Figure 1. Recombinant Δ190-196 PrP forms amyloid fibrils.

A, Kinetics of AF formation. Recombinant PrP, either WT (in black) or Δ190-196 PrP (in red), was incubated under mild (standard) condition in tubes, in the presence of 2M of guanidine. AF formation was followed by ThT fluorescence (10 µM). The protein concentration was 22 µM. Each time point was measured in triplicate and mean and standard deviations (sd) calculated. Each curve was fitted to a sigmoid function with flat initial and final baselines yielding lag times of 45 and 18 h for WT and Δ190-196 PrP, respectively. **B**, Length of AF lag phase determined equivalent in multi-well plates semi-automated assay. WT rPrP (black) and Δ190-196 rPrP (red) were incubated at 22µM in plates with intermittent shaking and fifrils formation followed by measure of ThT fluorescence. The length of the nucleation phase was determined by calculation of tangents and histograms are mean ± sd of 6 wells. **C**, Electron microscopy images of AFs of Δ190-196 PrP (a and b) and of WT PrP (c and d). Close-ups of the red square insets, shown in b and d, suggest intertwining of two protofibrils. **D**, AFM image of AFs made from Δ190-196 PrP under standard conditions. **E**, AFM image of Δ190-196 PrP AF produced without shaking. AFs appeared only after two or three weeks, the number of fibrils was reduced and they tend to be longer than with shaking. The image also suggests intertwined protofibrils.

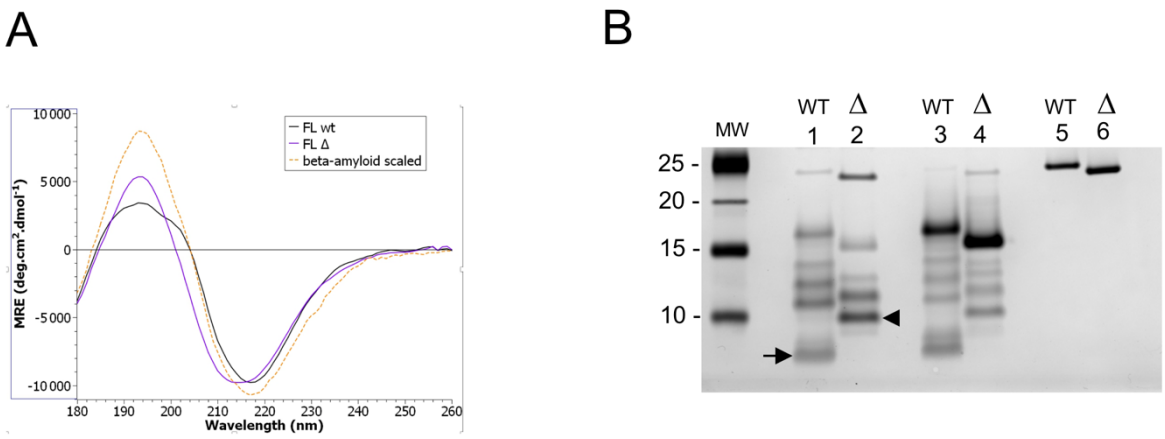

Figure 2. Synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) spectra and PK digestion patterns of WT and Δ190-196 AFs.

A, SRCD spectra at 25°C are shown for WT PrP (black) and Δ190-196 PrP (purple) AFs. The SRCD spectrum of beta-amyloid Aβ42 fibrils (PCDDB ID CD0003900000, scaled by a 1/5 factor: orange dashed line), representative of cross-β structure, was superimposed for comparison. **B**, Immunoblot of WT PrP (lanes 1, 3, 5) and Δ190-196 PrP (lanes 2, 4, 6) AFs treated or not with proteinase K. AFs were left untreated (lanes 5 and 6) or treated with PK at a protein ratio PK:PrP 1/215, either directly (lanes 1 and 2) or after "annealing" (lanes 3 and 4), i.e. after addition of 1% triton followed by a temperature rise in a PCR machine (1 min 20°C / 5 cycles (80°C 1min, 37°C 1 min) / 30min 15°C). In both conditions, the lower 6-8 kDa band disappeared (arrow) and the proportion of the 10-kDa band increased (arrowhead) for Δ190-196 PrP AFs versus WT.

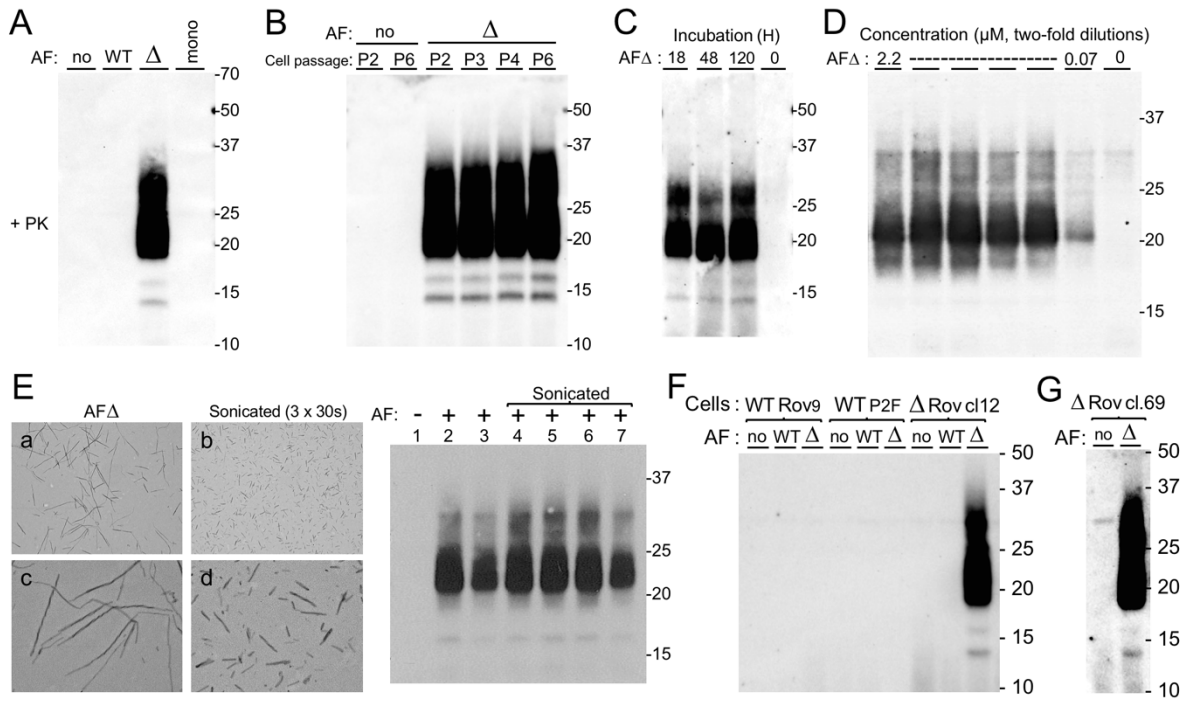

Figure 3. Amyloid fibrils from Δ190-196 rPrP induce conversion of Δ190-196 PrP^{C} into PrP^{Sc} in RK13 cells.

Immunoblots of PK-treated samples from RK13 cells expressing Δ190–196 PrP^{C}, Rov clone 12 (A to F) and Rov clone 69 (G) or WT PrP^{C} (Rov clone 9 and Rov clone P2FJ6) (F). The equivalent of 250µg of whole cell lysate protein were PK-treated and loaded in each lane (A, B, F, G) or only half (C, D, E) and PrP^{res} was detected by ShA31 monoclonal antibody. **A**, Samples were from Δ190-196 Rov cells exposed to WT PrP (WT) AF or Δ190-196 PrP (Δ) AF, to medium only (no), or to monomeric alpha helical Δ190-196 rPrP (mono) at a concentration equivalent to 2.2µM of PrP. Detection of PK-resistant PrP^{Sc} four cell passages after exposure is schown. **B**, Samples were from Δ190-196 Rov cells exposed or not to Δ190-196 PrP AF and assayed for PrP^{res} at different cell culture passages as indicated on the top. **C**, Cells were exposed to 2.2µM of Δ190-196 AF for the time indicated before washing and subculturing. The Presence of PK-resistant PrP^{Sc} was tested at passage three. **D**, Cells were incubated with serial two-fold dilutions of Δ190-196 rPrP AF (2.2µM starting concentration) and tested three passages post-infection. **E**, Exposure of Δ190-196 Rov cells to sonicated Δ190-196 rPrP AF. Left panels, EM images at two different magnifications of Δ190-196 AF, before (a and c) and after sonication for 3 x 30 seconds (b and d). Right panel immunoblot of clone 12 left uninfected (lane 1) or infected with Δ190-196 AF without previous sonication (lanes 2 and 3) or after sonication either 3 x 30 seconds (lanes 4 and 5) or 9 x 30 seconds (lanes 6 and 7) at two different

concentrations, 2μM equivalent PrP (lanes 2, 4, 6) or 1μM only (lanes 3, 5, 7). **F**, Rov9 clone expressing the WT ovine PrP^C in an inducible manner (51), the P2FJ6 clone constitutively expressing the WT PrP^C (22) and Δ190-196 Rov clone 12 were incubated with WT AF (WT), Δ190-196 AF (Δ) or left without AF (no) and assayed for PrP^{res} four passages after incubation. **G**, Δ190-196 Rov clone 69 was a newly isolated clone of RK13 cells expressing the mutant PrP^C that, as clone 12, did not produced the spontaneous prion even after several months of culture. This clone but was also susceptible to Δ190-196 rPrP AF.

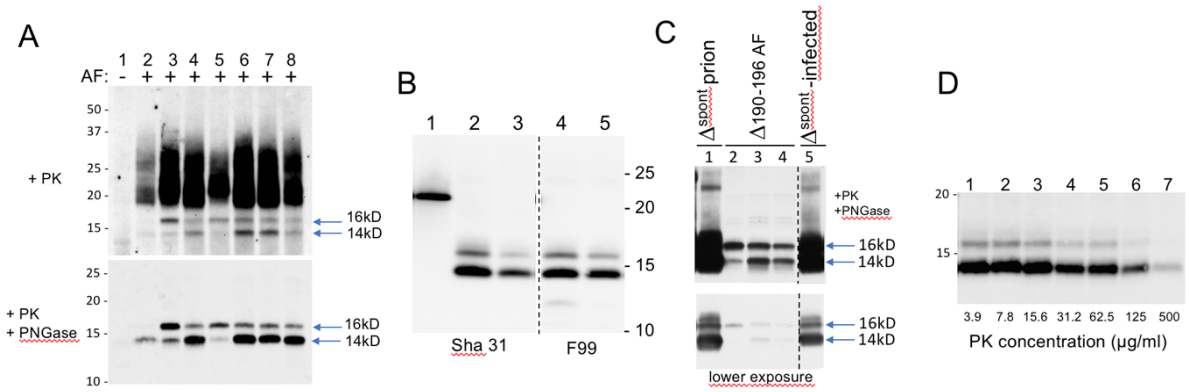

Figure 4. **Characteristics of the protease-resistant Δ190-196 PrP^{Sc}**

A, Electrophoretic profile of PrP^{res} obtained from clone 12 cells challenged with independent batches of Δ190-196 AF, before (higher panel) and after PNGase treatment (lower panel). All samples were equivalent to 250µg of PK-treated protein. Samples representative of several infection experiments for each batch were loaded together onto the same gel to compare PrP^{res} profiles. After PNGase treatment, PrP^{res} was resolved in two polypeptides of 16-kDa and 14-kDa, as indicated by arrows. **B**, Immunoblot of recombinant Δ190-196 PrP (lane 1) and PNGase treated Δ190-196 PrP^{res} induced by AF in clone 12 cells (lanes 2 to 5). The same two PrP^{res} samples (either lanes 2 and 4 or lanes 3 and 5) were loaded on a same gel, which was cut and incubated with either Sha31 or the C-terminal F99/97.6.1 monoclonal antibody. **C**, Comparison of electrophoretic profiles of AF-induced PrP^{res} (lanes 2 to 4) with that of Δ^{Spont} prion (lane 1) and Δ^{Spont} prion-infected clone 12 cells (lane 5). PrP^{res} recovered from a same amount of PK-digested cellular protein was further treated by PNGase and loaded on the gel. AF-induced 16-kDa and 14-kDa bands showed the same electrophoretic mobility than the two main bands of Δ^{Spont} prion and clone 12 cells infected by the spontaneous prion. Sha31 monoclonal antibody **D**, Proteinase K resistance of AF-induced PrP^{res} was determined by incubation of cell lysates with two-fold dilutions of PK. PK concentration in the reaction is indicated.

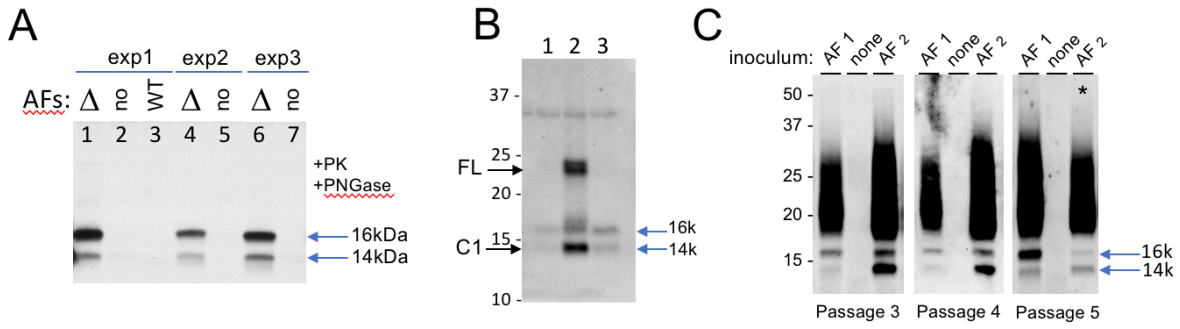

Figure 5. **Consistency of specific PrP^{res} profile induced by AF.**

A, Reproducibility of specific PrP^{res} pattern in three independent experiments with the same AF batch than that used in lane 3 of Fig. 4A. **B**, A cell lysate of AF-induced clone 12 was left untreated (lane 2) or PK-treated at 10µg/mg of protein (lane 3) or 50µg/mg of protein (lane 1) then treated by PNGase F and the equivalents of 10µg of cellular proteins were loaded on the gel. The full length protein (FL) and the C1 fragment of PrP (C1) are clearly identifiable in sample not treated by PK (lane 2). The 16-kDa species is resistant to a high concentration of PK (lane 3). **C**, In a same experiment, cells were incubated with two different batches of AF (AF1 and AF2) producing different PrP^{res} pattern. The specific PrP^{res} pattern was maintained through passages of the cell cultures. At passage 5 (right panel), to avoid overexposure impairing comparison, ten-fold less PK-treated proteins were loaded for AF2 (last lane *) than for AF1 sample. Batch AF1 is the same than for part A and B of this figure.

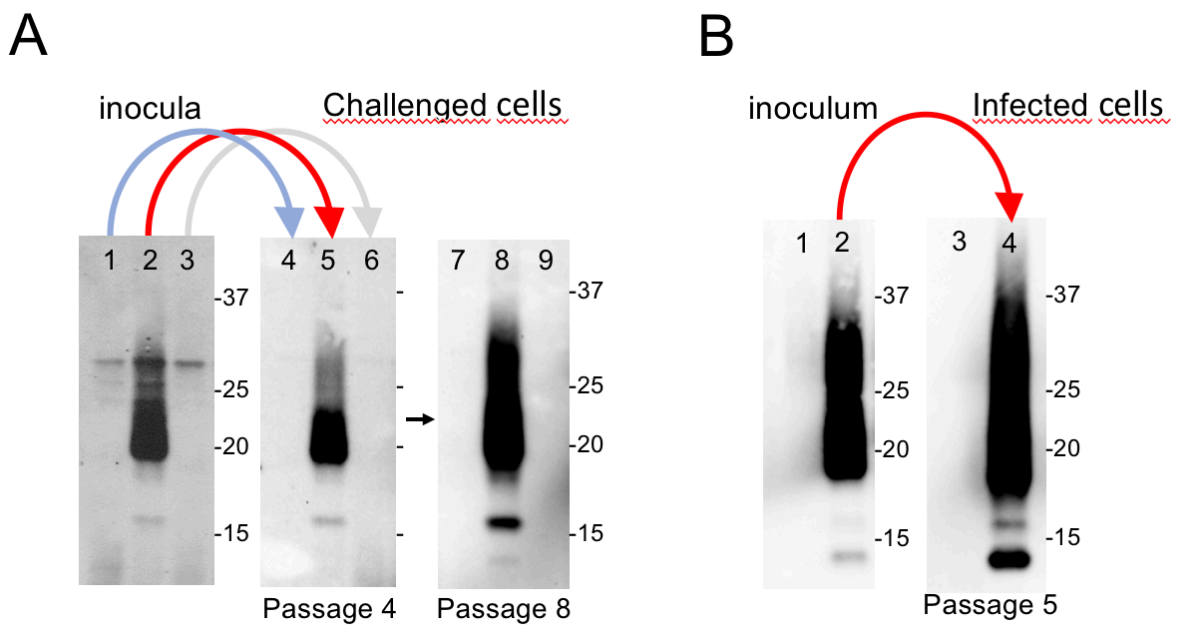

Figure 6. AF-induced PrP^{Sc} is *de novo* infectious.

A, Right panel: clone 12 cells were left untreated (lane 1) or were incubated with 2µM AF1 (lane 2) as in Fig. 5C. Non-transfected RK13 cells devoid of PrP expression were also incubated with 2µM AF1 (lane 3). Cells were grown for five passages, after which PrP^{res} profiles were established and cell lysates produced for infection. Naïve clone 12 cells were *de novo* infected (middle and the left panels) by the cell lysates either from control clone 12 (lanes 4 and 7), AF1-infected clone 12 (lane 5 and 8) or AF1-infected RK13 cells (lanes 6 and 9). Middle panel shows PK-treated samples at passage four post-infections and the left panel at passage eight. **B**, Clone 12 cells were incubated with AF2 as in Fig. 5C and grown until passage 5 (lane 2), then the cell lysate was used to *de novo* infect naïve clone 12 cells (lane 4) as in A, but with another batch of AF (AF2) inducing a different PrP^{res} profile with predominant 14-kDa band. lanes 1 and 3 are uninfected control cells. Note that both in A and B, the PrP^{res} profile of the infecting PrP^{Sc} inoculum produced by AF-infected cells was transmitted and maintained upon *de novo* infection.

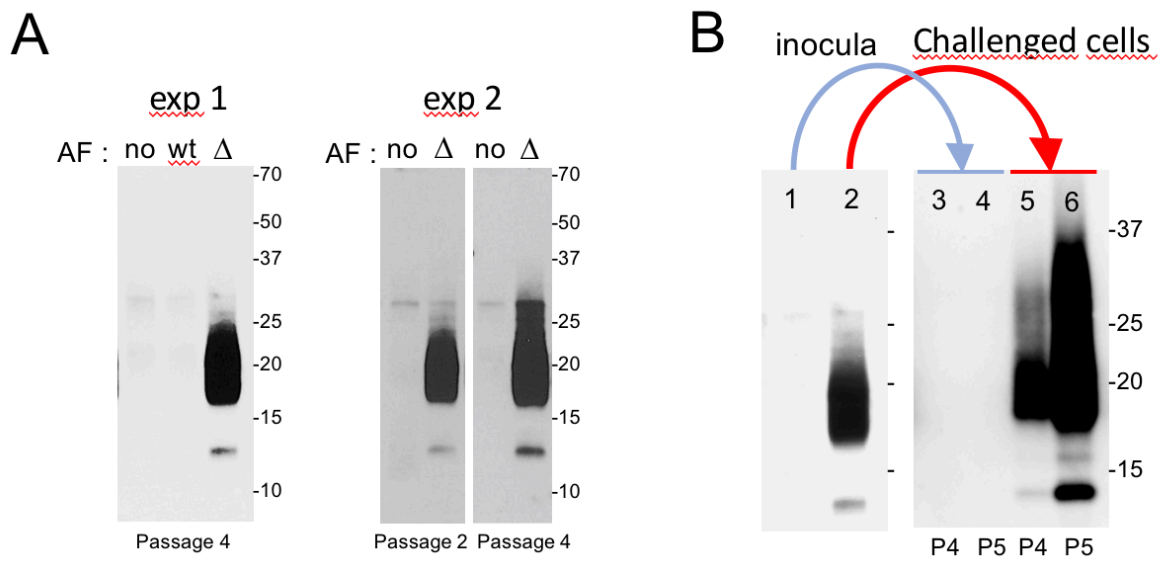

Figure 7. AFs of the full length mutant PrP induce conversion into prion of the Δ190-196 $C1_{113}$ PrP expressed in cells.

A, In the first experiment (left panel), Rov cells that expressed only the Δ190-196 $C1_{113}$ portion of the mutant PrP^{C} were incubated with 2µM AFs of either WT rPrP (lane 2) or Δ190-196 rPrP (lane 3) or left without AF (lane 1). PrP^{res} content at passage 4 is shown. In the second experiment (right panels) $\Delta C1_{113}$ Rov cells were or not incubated with AF of Δ190-196 PrP and the PrP^{res} profiles were established at passage 2 and 4 post-exposure as indicated. **B**, infection of Δ190-196 Rov clone 12 by mutant $C1_{113}$ PrP^{Sc}. Left panel, $\Delta C1_{113}$ Rov cells were exposed to AF of the full-length mutant rPrP or not (lanes 2 and 1, respectively). Lysates from both cultures were used at passage five to *de novo* infect naïve clone 12 cells and the PrP^{res} content was assayed at four and five passages of cultures post-infection. Δ190-196 Rov Clone 12 cells inoculated with the lysate containing $C1_{113}$ PrP^{res} were productively infected (lanes 5 and 6) and produced in turn accumulation of PrP^{res} with both 16-kDa and 14-kDa bands.

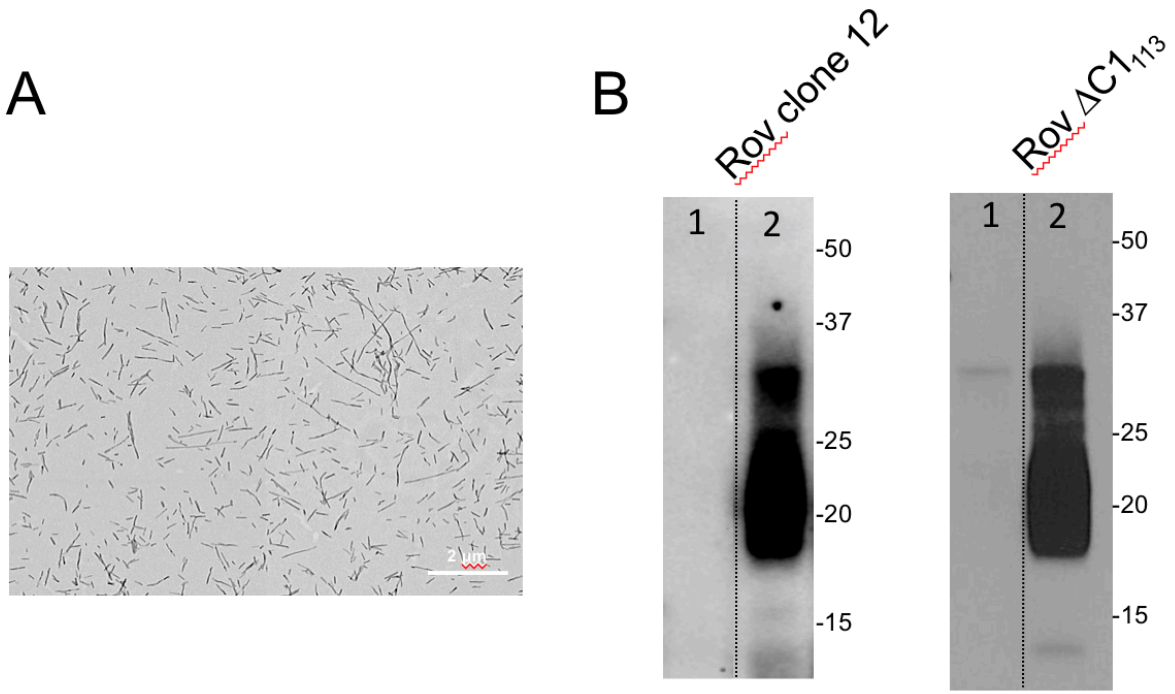

Figure 8. AFs of N-terminally truncated mutant PrP (Δ25-102, Δ190-196) retain synthetic prion activity for both mutant PrP and its C-terminal part.

A, Electron microscopy image of AFs produced with the double mutant (Δ25-102, Δ190-196) PrP. **B**, Rov clone 12 cells that expressed the full-length Δ190-196 PrP and $\Delta C1_{113}$ Rov cells that expressed only the C-terminal portion of the mutant PrP were challenged by AFs from N-terminally (25-102) deleted Δ190-196 PrP. Immunoblot of PK-treated samples from control cells (lane 1) and cells incubated with 2µM AF (lane 2). Left panel shows PrP^{res} accumulated in clone 12 cells at passage 5 post-AF infection and the right panel C1 PrP^{res} accumulated in cells expressing the mutant $C1_{113}$ polypeptide four passages after double mutant PrP AF exposure.

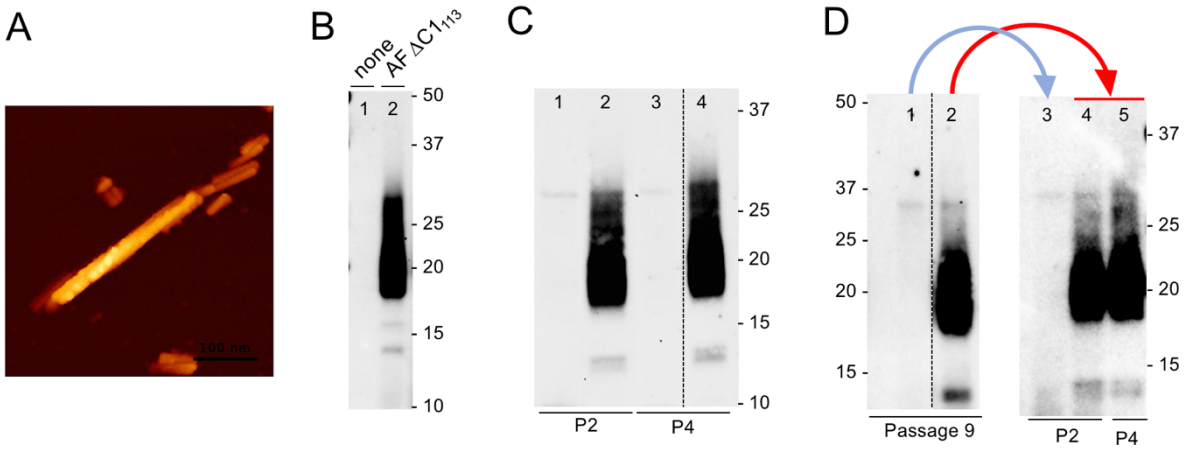

Figure 9. AFs of recombinant Δ190-196 $C1_{113}$ induce conversion of the cell-expressed homologous segment into a C1-like prion.

A, AFM image of *in vitro* made AFs of recombinant C-terminal 113-234 fragment of Δ190-196 PrP, i.e. the Δ190-196 $C1_{113}$ polypeptide. **B** to **D**, Immunoblots of PK treated samples revealed by Sha31 monoclonal antibody. **B**, Δ190-196 Rov clone 12 cells were left untreated (lane 1) or exposed to AF of Δ190-196 $C1_{113}$ PrP (lane 2). PrP^{res} with 16-kDa and 14-kDa bands accumulated in clone 12 cells eight passages after exposure is shown. **C**, Δ190-196 $C1_{113}$ Rov cells were left untreated (lane 1 and 3) or exposed to AF of Δ190-196 $C1_{113}$ PrP (lane 2 and 4). $C1_{113}$ PrP^{res} was detected at passage 2 and was maintained by subcultering cells. **D**, right panel, uninfected Δ190-196 $C1_{113}$ Rov cells (lane 1) and cells infected by AF of the homologous recombinant polypeptide (lane 2) were cultured for nine passages, at which time cellular lysates we done to *de novo* infect naïve cells. Only the cell lysate containing C-terminal PrP^{res} was infectious and induced transconformation of mutant $C1_{113}$ polypeptide expressed in Rov cells (right panel lanes 4 and 5).

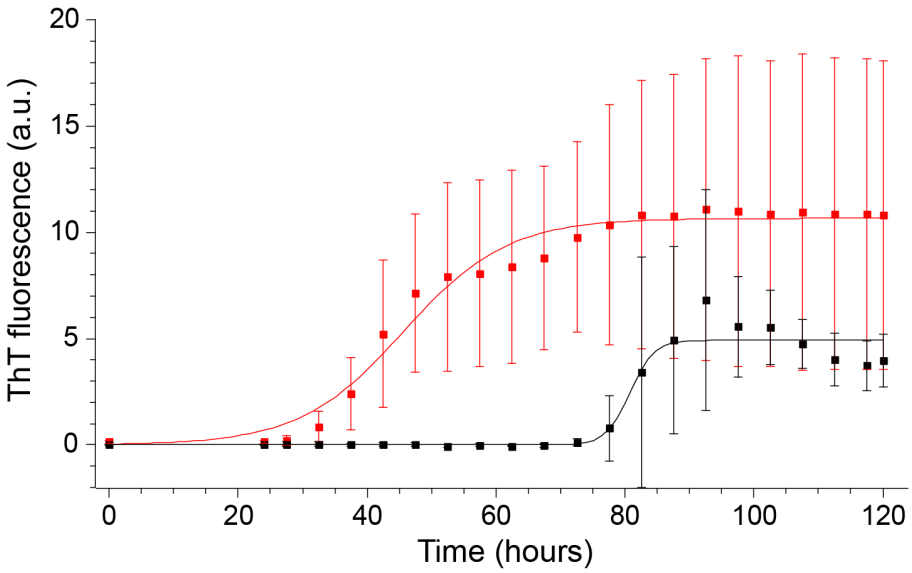

Figure S1. AF formation in multi-well plates followed by ThT fluorescence.

WT PrP (black) and Δ190-196 PrP (red) (22 μM) were incubated in buffer containing 2 M guanidinium chloride with intermittent agitation and in the presence of 10 μM ThT to follow fibril formation. Mean and standard deviation were calculated at different time points from 4 reactions in individual wells of the same plate. Data were fitted with a sigmoid function ($A/(1+\exp(-(t-t_{1/2})/\tau))$). Lag times determined as $t_{1/2}-2*\tau$ were 77 h and 29 h for WT PrP and Δ190-196 PrP, respectively. The wells show an important variability, but overall the nucleation phase is markedly reduced for the mutant protein.

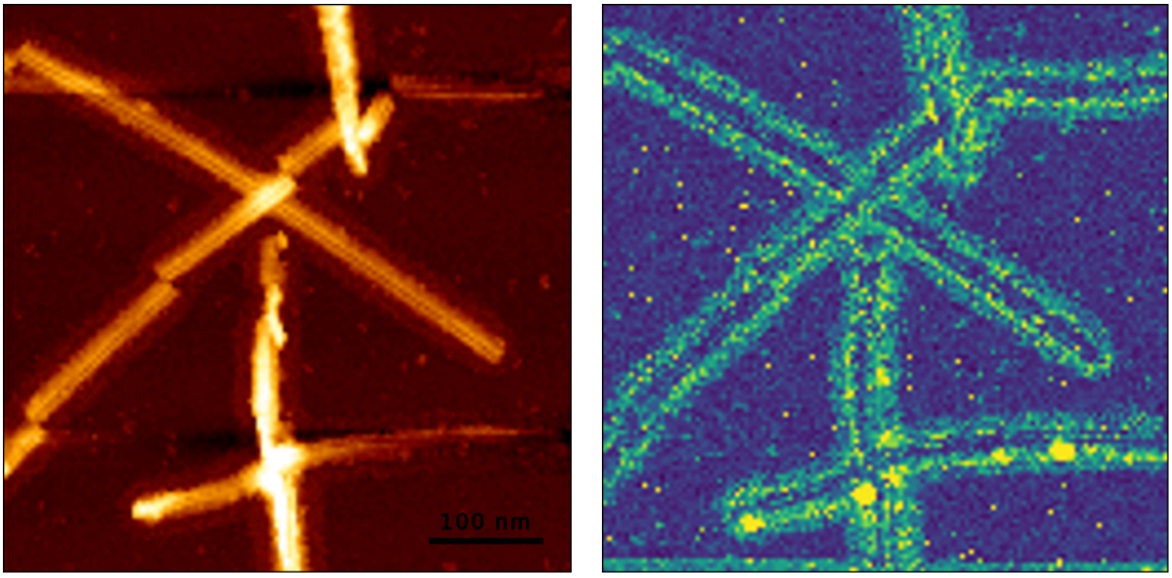

Figure S2. The N-terminal tail of Δ190-196 PrP is outside the amyloid core.

AFM image from a batch of fibrils made at high PrP concentration (120µM). Left panel: the image shows regular repetitions each 9 nm all along the core of fibrils. contains two protofibrils. the height of the structure was only 5 nm while the width of the dense core structure was 29 nm that even with the inherent slight overestimation is compatible with an arrangement of two protofibrils as recently described (29). Right panel, the positively charged N-terminal flexible part of PrP was detected outside and surrounding the cross beta sheet amyloid core.

PrP variant	**WT**	**WT**	**Δ190-196**	**Δ190-196**
Best factor	1	1.5	1	2
Helix	8%	7%	9%	9%
Antiparallel	22%	16%	27%	14%
Parallel	17%	22%	5%	14%
Turn	11%	10%	15%	15%
Other	42%	45%	44%	48%
RMSD	*0.1136*	*0.1514*	0.1011	0.0797
NRMSD	*0.03281*	*0.02914*	0.06847	0.027

Figure S3. SRCD spectrum deconvolution.

Deconvolution was done using the BeStSel server (48), either without or with Best factor correction. The table shows the percentage of secondary structures, the RMSD and normalized RMSD between fitted and experimental data. For both WT and Δ190-196 PrP, parallel beta and turn structures amount to ~30 %, which is compatible with the length of the core region present in the 3D structure of in vitro generated rPrP AFs (29). ~45 % of the proteins adopts other structures, which can be mainly assigned to the disordered N-terminus.

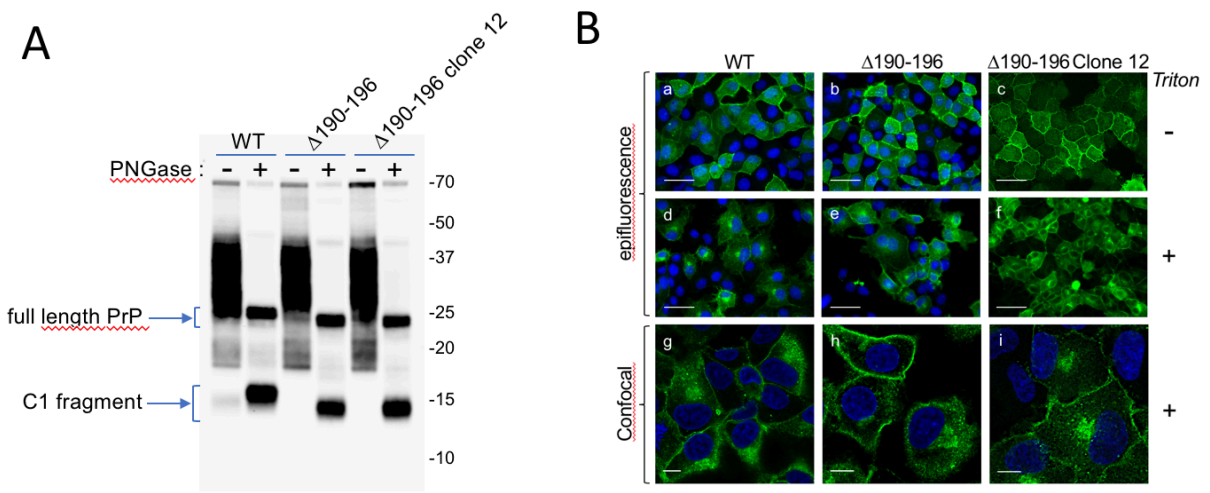

Figure S4. Expression of the WT and Δ190-196 PrP in RK13 cells

A, Comparison by immunoblotting of the electrophoretic profiles before and after PNGase F treatment of WT PrP and Δ190–196 mutant PrP expressed in cell populations with the Δ190-196 PrP expressed in the clone 12 of Rov cells. The position of full length protein and the C1 fragment of PrP are indicated on left and those of molecular mass markers on the right **B**, Localization of WT and mutant PrP in RK13 cells. Detection of PrP by immunofluorescence on paraformaldehyde-fixed cells permeabilized or not with triton. Stably transfected Rov cell cultures that expressed the WT PrP (a, d, g) or the Δ190-196 mutant PrP (b, e, h) and the Δ190-196 Rov clone 12 that did not produced spontaneously the Δ^{Spont} prion (c, f, i) are shown. Confocal analysis (g, h, i). Nuclei were colored in blue by DAPI. Bars 50µm (a-f) or 10µm (g-i). 4F2 anti-PrP monoclonal antibody.

References

1. Prusiner, S. B. (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* **47**, 601-623
2. Ayers, J. I., Paras, N. A., and Prusiner, S. B. (2020) Expanding spectrum of prion diseases. *Emerg Top Life Sci* **4**, 155-167
3. Aigle, M., and Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet* **136**, 327-335
4. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Son, M., Bezsonov, E. E., DeWilde, M., and Ducatez, M. (2018) Yeast Prions Compared to Functional Prions and Amyloids. *J Mol Biol* **430**, 3707-3719
5. Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997) The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9773-9778
6. Wickner, R. B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **264**, 566-569

7. Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Coulary-Salin, B., and Saupe, S. J. (2002) Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7402-7407
8. Daskalov, A., Martinez, D., Coustou, V., El Mammeri, N., Berbon, M., Andreas, L. B., Bardiaux, B., Stanek, J., Noubhani, A., Kauffmann, B., Wall, J. S., Pintacuda, G., Saupe, S. J., Habenstein, B., and Loquet, A. (2021) Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
9. Heinrich, S. U., and Lindquist, S. (2011) Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal Aplysia cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2999-3004
10. Si, K., Choi, Y. B., White-Grindley, E., Majumdar, A., and Kandel, E. R. (2010) Aplysia CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell* **140**, 421-435
11. Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144
12. Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Cass, C., Da Costa, M., Conneally, P. M., Hodes, M. E., Ghetti, B., and Prusiner, S. B. (1992) Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat Genet* **1**, 68-71
13. Mead, S., Lloyd, S., and Collinge, J. (2019) Genetic Factors in Mammalian Prion Diseases. *Annu Rev Genet* **53**, 117-147
14. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., and Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-150
15. Caldarulo, E., Barducci, A., Wuthrich, K., and Parrinello, M. (2017) Prion protein beta2-alpha2 loop conformational landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 9617-9622
16. Baron, G. S., Hughson, A. G., Raymond, G. J., Offerdahl, D. K., Barton, K. A., Raymond, L. D., Dorward, D. W., and Caughey, B. (2011) Effect of glycans and the glycophosphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry* **50**, 4479-4490
17. Prusiner, S. B., Gabizon, R., and McKinley, M. P. (1987) On the biology of prions. *Acta Neuropathol* **72**, 299-314
18. Faucheux, B. A., Morain, E., Diouron, V., Brandel, J. P., Salomon, D., Sazdovitch, V., Privat, N., Laplanche, J. L., Hauw, J. J., and Haik, S. (2011) Quantification of surviving cerebellar granule neurones and abnormal prion protein (PrPSc) deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease supports a pathogenic role for small PrPSc deposits common to the various molecular subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol* **37**, 500-512
19. Halliday, M., Radford, H., and Mallucci, G. R. (2014) Prions: generation and spread versus neurotoxicity. *J Biol Chem* **289**, 19862-19868
20. Dickinson, A. G., Meikle, V. M., and Fraser, H. (1968) Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol* **78**, 293-299
21. Carlson, G. A., Ebeling, C., Yang, S. L., Telling, G., Torchia, M., Groth, D., Westaway, D., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1994) Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5690-5694
22. Chapuis, J., Moudjou, M., Reine, F., Herzog, L., Jaumain, E., Chapuis, C., Quadrio, I., Boulliat, J., Perret-Liaudet, A., Dron, M., Laude, H., Rezaei, H., and Beringue, V.

(2016) Emergence of two prion subtypes in ovine PrP transgenic mice infected with human MM2-cortical Creutzfeldt-Jakob disease prions. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 10

23. Cassard, H., Huor, A., Espinosa, J. C., Douet, J. Y., Lugan, S., Aron, N., Vilette, D., Delisle, M. B., Marin-Moreno, A., Peran, P., Beringue, V., Torres, J. M., Ironside, J. W., and Andreoletti, O. (2020) Prions from Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients Propagate as Strain Mixtures. *mBio* **11**
24. Igel-Egalon, A., Beringue, V., Rezaei, H., and Sibille, P. (2018) Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena. *Pathogens* **7**
25. 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
26. Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., and Caughey, B. (2014) Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem* **289**, 24129-24142
27. Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., Biasini, E., and Requena, J. R. (2019) Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog* **15**, e1007864
28. Baskakov, I. V., Caughey, B., Requena, J. R., Sevillano, A. M., Surewicz, W. K., and Wille, H. (2019) The prion 2018 round tables (I): the structure of PrP(Sc). *Prion* **13**, 46-52
29. Wang, L. Q., Zhao, K., Yuan, H. Y., Wang, Q., Guan, Z., Tao, J., Li, X. N., Sun, Y., Yi, C. W., Chen, J., Li, D., Zhang, D., Yin, P., Liu, C., and Liang, Y. (2020) Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 598-602
30. Salamat, K., Moudjou, M., Chapuis, J., Herzog, L., Jaumain, E., Beringue, V., Rezaei, H., Pastore, A., Laude, H., and Dron, M. (2012) Integrity of helix 2-helix 3 domain of the PrP protein is not mandatory for prion replication. *J Biol Chem* **287**, 18953-18964
31. Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Chapuis, J., Ciric, D., Igel-Egalon, A., Laude, H., Beringue, V., Rezaei, H., and Dron, M. (2016) Generating Bona Fide Mammalian Prions with Internal Deletions. *J Virol* **90**, 6963-6975
32. Munoz-Montesino, C., Larkem, D., Barbereau, C., Igel-Egalon, A., Truchet, S., Jacquet, E., Nhiri, N., Moudjou, M., Sizun, C., Rezaei, H., Beringue, V., and Dron, M. (2020) A seven-residue deletion in PrP leads to generation of a spontaneous prion formed from C-terminal C1 fragment of PrP. *J Biol Chem* **295**, 14025-14039
33. 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
34. Tveit, H., Lund, C., Olsen, C. M., Ersdal, C., Prydz, K., Harbitz, I., and Tranulis, M. A. (2005) Proteolytic processing of the ovine prion protein in cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 232-240
35. Oliveira-Martins, J. B., Yusa, S., Calella, A. M., Bridel, C., Baumann, F., Dametto, P., and Aguzzi, A. (2010) Unexpected tolerance of alpha-cleavage of the prion protein to sequence variations. *PLoS One* **5**, e9107
36. Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**, 1255-1264

37. Lewis, V., Hill, A. F., Haigh, C. L., Klug, G. M., Masters, C. L., Lawson, V. A., and Collins, S. J. (2009) Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 1125-1135
38. Westergard, L., Turnbaugh, J. A., and Harris, D. A. (2011) A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant-negative inhibitor of PrPSc formation. *J Biol Chem* **286**, 44234-44242
39. Colby, D. W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I. V., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2009) Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20417-20422
40. Muller, H., Brener, O., Andreoletti, O., Piechatzek, T., Willbold, D., Legname, G., and Heise, H. (2014) Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion* **8**, 344-358
41. Kraus, A., Raymond, G. J., Race, B., Campbell, K. J., Hughson, A. G., Anson, K. J., Raymond, L. D., and Caughey, B. (2017) PrP P102L and Nearby Lysine Mutations Promote Spontaneous In Vitro Formation of Transmissible Prions. *J Virol* **91**
42. Kim, C., Xiao, X., Chen, S., Haldiman, T., Smirnovas, V., Kofskey, D., Warren, M., Surewicz, K., Maurer, N. R., Kong, Q., Surewicz, W., and Safar, J. G. (2018) Artificial strain of human prions created in vitro. *Nat Commun* **9**, 2166
43. Choi, J. K., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2016) Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13851-13856
44. Moda, F., Le, T. N., Aulic, S., Bistaffa, E., Campagnani, I., Virgilio, T., Indaco, A., Palamara, L., Andreoletti, O., Tagliavini, F., and Legname, G. (2015) Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathog* **11**, e1005354
45. Colby, D. W., Wain, R., Baskakov, I. V., Legname, G., Palmer, C. G., Nguyen, H. O., Lemus, A., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2010) Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog* **6**, e1000736
46. Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D., and Prusiner, S. B. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* **35**, 5528-5537
47. Safar, J. G., Xiao, X., Kabir, M. E., Chen, S., Kim, C., Haldiman, T., Cohen, Y., Chen, W., Cohen, M. L., and Surewicz, W. K. (2015) Structural determinants of phenotypic diversity and replication rate of human prions. *PLoS Pathog* **11**, e1004832
48. Micsonai, A., Wien, F., Bulyaki, E., Kun, J., Moussong, E., Lee, Y. H., Goto, Y., Refregiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res* **46**, W315-W322
49. Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2006) Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. *J Biol Chem* **281**, 2373-2379
50. Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Gill, A. C., and Baskakov, I. V. (2005) Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci* **14**, 1222-1232
51. Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., and Laude, H. (2001) Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4055-4059

52. Anderson, M. R., Akeeb, A., Lavela, J., Chen, Y., and Mellman, T. A. (2017) Period 3 gene polymorphism and sleep adaptation to stressful urban environments. *J Sleep Res* **26**, 115-118
53. Apetri, A. C., Surewicz, K., and Surewicz, W. K. (2004) The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J Biol Chem* **279**, 18008-18014
54. Salamat, M. K., Dron, M., Chapuis, J., Langevin, C., and Laude, H. (2011) Prion propagation in cells expressing PrP glycosylation mutants. *J Virol* **85**, 3077-3085
55. Rezaei, H., Marc, D., Choiset, Y., Takahashi, M., Hui Bon Hoa, G., Haertle, T., Grosclaude, J., and Debey, P. (2000) High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur J Biochem* **267**, 2833-2839
56. Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., and Grassi, J. (2005) Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* **280**, 11247-11258
57. Krasemann, S., Groschup, M., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1996) Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP0/0 mice. *J Immunol Methods* **199**, 109-118
58. O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Besser, T. E., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Wells, G. A., Ryder, S. J., Parish, S. M., Hamir, A. N., Cockett, N. E., Jenny, A., and Knowles, D. P. (2000) Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* **38**, 3254-3259
59. Spraker, T. R., O'Rourke, K. I., Balachandran, A., Zink, R. R., Cummings, B. A., Miller, M. W., and Powers, B. E. (2002) Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (Odocoileus hemionus) with chronic wasting disease. *J Vet Diagn Invest* **14**, 3-7
60. Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andreoletti, O., Rezaei, H., Dron, M., and Beringue, V. (2016) Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. *Sci Rep* **6**, 29116
61. Dron, M., Moudjou, M., Chapuis, J., Salamat, M. K., Bernard, J., Cronier, S., Langevin, C., and Laude, H. (2010) Endogenous proteolytic cleavage of disease-associated prion protein to produce C2 fragments is strongly cell- and tissue-dependent. *J Biol Chem* **285**, 10252-10264
62. Dron, M., Dandoy-Dron, F., Farooq Salamat, M. K., and Laude, H. (2009) Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. *J Gen Virol* **90**, 2050-2060
63. Torrent, J., Martin, D., Noinville, S., Yin, Y., Doumic, M., Moudjou, M., Beringue, V., and Rezaei, H. (2019) Pressure Reveals Unique Conformational Features in Prion Protein Fibril Diversity. *Sci Rep* **9**, 2802
64. Breydo, L., Makarava, N., and Baskakov, I. V. (2008) Methods for conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Methods Mol Biol* **459**, 105-115
65. Rezaei, H., Choiset, Y., Eghiaian, F., Treguer, E., Mentre, P., Debey, P., Grosclaude, J., and Haertle, T. (2002) Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J Mol Biol* **322**, 799-814
66. Miles, A. J., and Wallace, B. A. (2018) CDtoolX, a downloadable software package for processing and analyses of circular dichroism spectroscopic data. *Protein Sci* **27**, 1717-1722

3. Discussion de la partie 2

Nous avons montré dans la partie 1 que la délétion des acides aminés HTVTTTT correspondant à une coupure de l'extrémité C-terminale de l'hélice H2 de la PrP conduit à la formation spontanée d'un prion dans les cellules Rov (Munoz *et al*., 2020). Nous montrons dans cette deuxième partie que l'introduction de la même délétion dans une PrP recombinante produite par E. coli permet la production *in vitro* de fibres amyloïdes qui se comportent comme des prions synthétiques en culture de cellule puisqu'elles induisent la conversion en entité prion résistante aux protéases et transmissible à la fois de la PrP homologue Δ190-196 et de sa partie C-terminale mimant le fragment C1.

Nous avons d'abord montré que la délétion 190-196 favorisait l'initiation des fibres amyloïdes produites *in vitro*, la phase de nucléation précédant l'apparition des fibres étant plus courte pour la PrP mutante que pour la WT. Il est tentant d'établir un parallèle entre cette facilité de la PrP mutante à changer de conformation *in vitro* et sa propension à former spontanément des prions dans les cellules. Dans les deux cas, la perte de stabilité due à la délétion pourrait être un élément important qui pourrait permettre de réduire le niveau d'énergie d'activation nécessaire au processus de conversion, facilitant ainsi le changement de conformation entre les deux états de la protéine et la formation du noyau de polymérisation.

Pour tester le potentiel infectieux des fibres, nous avons utilisé deux lignées de cellules Rov qui n'ont pas produit spontanément de prion même après des mois de culture. Nous avons montré que les fibres Δ190-196 induisent la conversion de la PrP mutante cellulaire vers un état résistant aux protéases à la fois dans un clone cellulaire exprimant la PrP mutante homologue et dans une population cellulaire qui exprime uniquement la partie C1 de la PrP Δ190-196. En revanche, l'incubation de ces mêmes cellules avec de les fibres WT n'induit pas la conversion de la PrP mutante ou de son fragment C1, ce qui indique qu'un contact des cellules avec un assemblage amyloïde n'est pas suffisant pour convertir la PrP mutante ou son fragment C1. Ces données suggèrent plutôt qu'une certaine compatibilité de séquence et/ou de structure entre les fibres infectantes et la PrP cellulaire est nécessaire à la conversion.

Les cellules traitées avec les fibres de PrP mutante ont produit une PrP^{Sc} qui présente les caractéristiques typiques d'un prion : résistance aux protéases, insolubilité et infectivité. La PrP^{res} accumulée dans les cellules à des caractéristiques proches ou similaires à celles du prion

spontané même si les taux obtenus sont la plupart du temps très inférieurs. Le profil PrP^{res} correspond aussi à deux polypeptides de 16kDa et 14kDa bien qu'une interversion du rapport quantitatif des bandes ait été notée à une ou deux occasions.

La partie N-terminale de la PrP est non structurée dans la PrP^{C} et reste sensible à la digestion par les protéases dans les prions. Le noyau infectieux résistant aux protéases du prion appelé fragment C2 correspond à la partie C-terminale et commence autour des résidus 85 à 100 pour les prions ovins, selon la souche. Le segment C2 de la PrP est suffisant pour la propagation du prion chez les souris transgéniques (Fischer *et al*., 1996). Nous avons montré ici que les fibres amyloïdes d'une PrP double mutante (Δ25-102 ; Δ190-196) c'est à dire délétée de la partie N-terminale induit encore efficacement la conversion de la PrP mutante entière et celle de son fragment C-terminal 113-234. Ainsi, comme pour les prions produit *in vivo*, la partie N-terminale non structurée n'est pas nécessaire pour l'infectivité des fibres.

Le fragment C1 de la PrP résulte du clivage de la partie N-terminale de la protéine par des métalloprotéases et cette partie C-terminale de la PrP est présente avec la protéine complète ancrée à la surface cellulaire. Le fragment C1 naturel est considéré comme trop court pour être converti en prion car dans la plupart des cas, la taille du polypeptide résistant à la PK est plus grande que celle du C1 (Fischer *et al*., 1996 ; Westergard *et al*., 2011). Une particularité du modèle cellulaire Rov Δ190-196 est sa capacité à fabriquer une entité prion de type C1 (cf. partie 1). Nous avons montré ici que l'infection de cellules qui expriment un segment C-terminal (113-234, Δ190-196) par les fibres de PrP Δ190-196 de pleine longueur ou tronquée en N-terminal produit également un prion de type C1.

La structure à haute résolution de la souche de prion 263K déterminée par cryo-EM a été très récemment rapportée (Kraus *et al*., 2021) ainsi que celle de fibres amyloïdes de PrP humaine recombinante dont le potentiel infectieux n'a pas été établi (Wang *et al*., 2020). Ces structures sont toutes deux des architectures de type PIRIBS (parallel in-register beta sheet) même si elles présentent des différences importantes. Les fibres de PrP recombinante sont constituées par l'enroulement symétrique de deux protofilaments alors que pour le prion 263K l'empilement des molécules avec feuillets beta similaires ne se fait que sur un seul élément fibrillaire. En revanche, en ce qui concerne notre région d'intérêt, les données sont assez similaires dans les deux cas : la séquence supprimée (HTVTTTT) contient un feuillet bêta intermoléculaire TVTT pour le prion ou TVTTT pour la fibre amyloïde (Wang *et al*., 2020), la

région est isolée dans l'arc bêta formé par le pont disulfure dans les deux cas et, étant située à l'extérieur, ne semble pas interagir avec d'autres parties de la molécule. Ce tronçon de résidus fait donc partie intégrante de la structure rigide et n'en est pas dissocié en étant relégué dans une boucle. La position des résidus HTVTTTT dans la structure rigide semble indiquer que leur suppression est tout à fait compatible avec la formation d'un nouveau type de prion mutant ou la formation de fibre associés à des propriétés spécifiques. La structure de tout le fragment C2 résistant aux protéases a été résolue pour le prion de hamster 263K. Cette structure montre que la région de 15 résidus en amont de la position ou commence le fragment C1 de hamster ne contient que deux petits feuillets bêta intermoléculaires et est également située vers l'extérieur de la structure. Cette situation est a priori compatible avec la formation d'un noyau C1 réduit qui pourrait maintenir intacte l'organisation centrale (clé grecque) des résidus hydrophobes.

4. Conclusion de la partie 2

Les fibres amyloïdes de PrP ovine sauvage produites *in vitro* ne sont pas infectieuses pour les cellules de Rov, mais une délétion spécifique dans la partie structurée de la protéine conduit à la formation de fibres particulières qui ont la capacité d'induire la conversion en prion de la protéine mutante homologue exprimée dans les cellules. Cela accroit encore l'intérêt d'établir la structure de ces prions synthétiques car i) la délétion Δ190-196 a supprimé des résidus inclus dans le noyau bêta-amyloïde et quatre d'entre eux sont associés à des cas familiaux de maladie à prion chez l'homme ii) les prions induits par les fibres tout comme le prion spontané sont non conventionnels iii) une portion C-terminale inhabituellement courte de la protéine comparable à son fragment C1 permet la formation de structures de type prion dans la cellule et de prion synthétique *in vitro*.

5. Travaux en cours et Perspective de la partie 2

1) L'étude de la structure des fibres amyloïdes de PrP mutantes ou de son fragment C-terminal

Une approche par spectroscopie RMN du solide est développée en détail dans la partie 3 et d'autres approches comme la Cryo-EM pourraient être envisagées pour établir leur structure.

2) Étudier l'effet de la délétion HTVTTTT sur la stabilité des formes enrichie en feuillet béta.

Bien que nous ayons démontré un effet de la délétion sur la stabilité de la forme native de la protéine qui explique en partie l'apparition spontané du prion Δ^{Spont} et la réduction de la phase de latence correspondant à la formation du noyau de polymérisation des fibres amyloïdes, un effet de la délétion permettant une augmentation de la stabilité des assemblages de PrP^{Sc} ou des fibres amyloïdes reste envisageable. En effet afin de faciliter la conversion spontanée de la PrP native vers sa forme enrichie en feuillet beta il faut d'une part défaire sa structure native et d'autre part former une nouvelle structure suffisamment stable pour pouvoir piéger la protéine dans cette nouvelle conformation. Ainsi comparer la stabilité des assemblages formés par la PrP mutante a ceux de la PrP sauvage pourrait nous apporter un nouvel élément de réponse sur le mécanisme ayant conduit à la formation spontanée du prion. Pour cela il faudra examiner l'évolution des structures secondaires des fibres de PrP Wt et mutée par dichroïsme circulaire ou par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier au cours d'une dénaturation thermique ou chimique (concentration croissante de GuHcl).

3) Vérifier l'infectivité de la partie PK résistante des fibres Δ190-196

Les fibres amyloïdes de PrP présentent une certaine résistance à la PK, ainsi en digérant avec des quantités modérées de PK les fibres préalablement à l'infection nous pourrions vérifier si le pouvoir infectieux des fibres est bien porté par la partie résistante à la PK. Éventuellement en utilisant des concentrations croissantes de PK il serait peut-être possible de déterminer la région minimum nécessaire à une infection dans notre système. Et bien sûr tester cette infectivité sur les souris transgéniques adéquates quand nous en disposerons (voir perspectives partie 1).

Partie 3 :

Étude structurale des fibres amyloïdes de PrP recombinante Δ190-196

1. Introduction

Dans cette troisième partie nous avons étudié par RMN du solide les fibres de PrP recombinante Δ190-196 de pleine longueur et tronquée. La résolution de la structure à haute résolution de la forme prion de la PrP est un des plus grands défis de ce domaine de recherche. L'étude structurale de la PrP^{Sc} est particulièrement difficile en raison de différents facteurs : d'abord les assemblages de PrP^{Sc} semblent être très hétérogènes, de plus la protéine est difficile à isoler, insoluble dans l'eau, polymérique et présente des degrés variables de modification post-traductionnel (Baskakov et al., 2018). L'étude de fibres amyloïdes de PrP recombinante permet de contourner certaines de ces difficultés, il est néanmoins important de garder à l'esprit que les deux molécules semblent afficher des différences sur le plan structural et infectieux (Muller *et al*., 2014 ; Wang *et al*. 2010).

Les fibres de PrP recombinantes ont été étudiées par RMN notamment car le fait d'exprimer la protéine en bactérie facilite le marquage aux isotopes lourd C^{13} et N^{15} nécessaire à l'utilisation de cette technique. La RMN, comme beaucoup d'autres techniques d'analyse structurale, exige des quantités substantielles d'échantillon structurellement homogène, la tendance de la PrP à adopter un nombre important de conformères a donc constituée une sérieuse limitation dans l'obtention d'une structure à haute résolution des fibres de PrP. La nature agrégative de la PrP sous forme fibrillaire exige le recours à la RMN du solide afin d'éviter l'importante relaxation longitudinale due à la faible mobilité moléculaire des fibres (Requena et Wille. 2017).

Une étude par RMN du solide a été réalisée par Muller et collaborateurs sur des fibres de PrP recombinante ovine. L'assignement sans ambiguïté de tous les résidus n'a pas pu être réalisé du fait d'une superposition des signaux notamment dans les régions très peuplées des spectres.

L'étude est arrivée à la conclusion que la région N-terminal est semi-mobile, que la région 115-155 semble former une hélice résiduelle, que la région 155 jusqu'à l'extrémité C-terminale constitue le cœur riche en feuillets β de la fibre et que les fibres adoptent l'organisation prédit par le modèle de structure « parallel-in-register intermolecular β-sheet » (PIRIBS) (Groveman et al., 2014) (Muller et al., 2014). Les résultats de l'étude par RMN du solide de Tycko et collaborateurs sur des fibres de PrP recombinantes de hamster confirment une compatibilité avec le modèle de structure « in-register » et suggèrent que pour leurs fibres le cœur riche en feuillets β se situe dans la région 173-224 (Tycko et al., 2010). Une autre étude par RMN du solide a été réalisée sur des fibres de PrP (23-144) recombinantes humaines infectieuses. Ces fibres ont permis l'obtention de spectres RMN de bonne qualité qui ont permis cette fois une attribution résidu spécifique du squelette peptidique de la protéine dans sa forme bêta amyloïde. Les spectres RMN démontrent sans ambiguïté que la région 112-141 comprenant 3 feuillets bêta reliés par des boucles plus ou moins longues représente le cœur bêta amyloïde de ces fibres et comme pour les fibres décrites précédemment la PrP adoptent une structure compatible avec le modèle PIRIBS. Cependant la structure à haute résolution de ces fibres de PrP (23-144) n'a pas pu être déterminée (Helmus *et al*. 2008). Récemment une structure à haute résolution (résolution moyenne de 2,7 Å) a été obtenue par cryo-microscopie électronique à partir de fibres amyloïdes de PrP recombinante humaine de pleine longueur. Bien que cette étude apporte des informations structurales précieuses elle ne décrit que la structure de la région 170-220, de plus ni la résistance à la PK ni l'infectivité des fibres étudiées n'a été évaluées et finalement il est possible que cette structure ne représente qu'une conformation parmi d'autres étant donné l'hétérogénéité structurale des fibres de PrP (Wang *et al*. 2020).

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé une propriété des fibres recombinantes de PrP appelée « annealing » qui consiste en une maturation des fibres en présence de Triton qui affecte leur résistance à la protéinase K. En effet, en absence de tout traitement les fibres présentent une certaine résistance aux protéases, cependant après la digestion les fragments PK^{res} obtenus sont majoritairement plus courts (10-12 KDa) que ceux des prions (PrP^{Sc}). Une incubation courte des fibres a 80°C, ou longue a 37°C, en présence de Triton permet un réarrangement structural des fibres qui produit un enrichissement en feuillet bêta visible par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Le traitement au Triton parait induire un allongement de la taille de leur corps résistant, produisant ainsi en un fragment plus long, de 16kDa, qui correspond à la taille des fragments PK^{res} de certaines PrP^{Sc}. Ce phénomène semble suggérer qu'au moins deux conformations thermodynamiquement stables sont accessibles aux

fibres de PrP, ces deux conformations sont séparées par une barrière énergétique importante et semblent se distinguer par la résistance ou la sensibilité à la PK de leur région (97-140) (Bocharova et al., 2006).

Les résultats issus de notre étude devraient apporter des informations structurales concernant les fibres de PrP et proposer des approches permettant d'optimiser l'étude par RMN du solide de ces molécules.

2. Résultats

2.1. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes de PrPΔ190-196 recombinante de pleine longueur par RMN du solide

Nous avons observé des fibres amyloïdes de PrP recombinante Δ190-196 de pleine longueur, marquées aux isotope ^{13}C et ^{15}N, par RMN du solide. Les fibres étaient conservées dans un tampon 10 mM acétate de sodium pH 5 à une concentration de 1,7 mM. A cette concentration elles se présentent dans le rotor sous forme de gel. Au total l'échantillon contenait 2,75 mg de fibre.

Des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplages dipolaires de type Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR) (Takegoshi *et al.*, 2001) ont été acquis afin d'observer la partie rigide des fibres. En effet, le couplage dipolaire ne s'exprime pas dans les parties flexibles. Il dépend de la distance entre deux noyaux (r) et varie en $1/r^3$. Pour les prions on s'attend à ce que cette partie s'étende du résidu 80 ou 100 jusqu'à l'extrémité C-terminale de la protéine, la région N-terminale étant prédite comme intrinsèquement désordonnée. Des spectres ont été acquis avec différents temps de mélange. Les temps courts (< 50 ms) permettent d'observer des signaux correspondants à des couplages dipolaires intra-résiduels, alors que les temps de mélange plus longs (>200 ms) permettent un transfert de magnétisation plus efficace aboutissant à des signaux correspondant à des couplages dipolaires séquentiels ou inter-résiduels. Toutes les mesures ont été effectuées en faisant tourner l'échantillon (rotor de 4 mm de diamètre) à l'angle magique, avec une vitesse de 11 kHz. La température était régulée à 293 K. Les spectres ont été acquis à une fréquence de 175.8 MHz pour le carbone 13 (^{13}C) et 699.3 MHz pour le proton (^{1}H). Un exemple est donné dans la **Figure 13**. Les déplacements chimiques ^{13}C ont été référencés avec de l'adamantane (Harris et al., 2008)

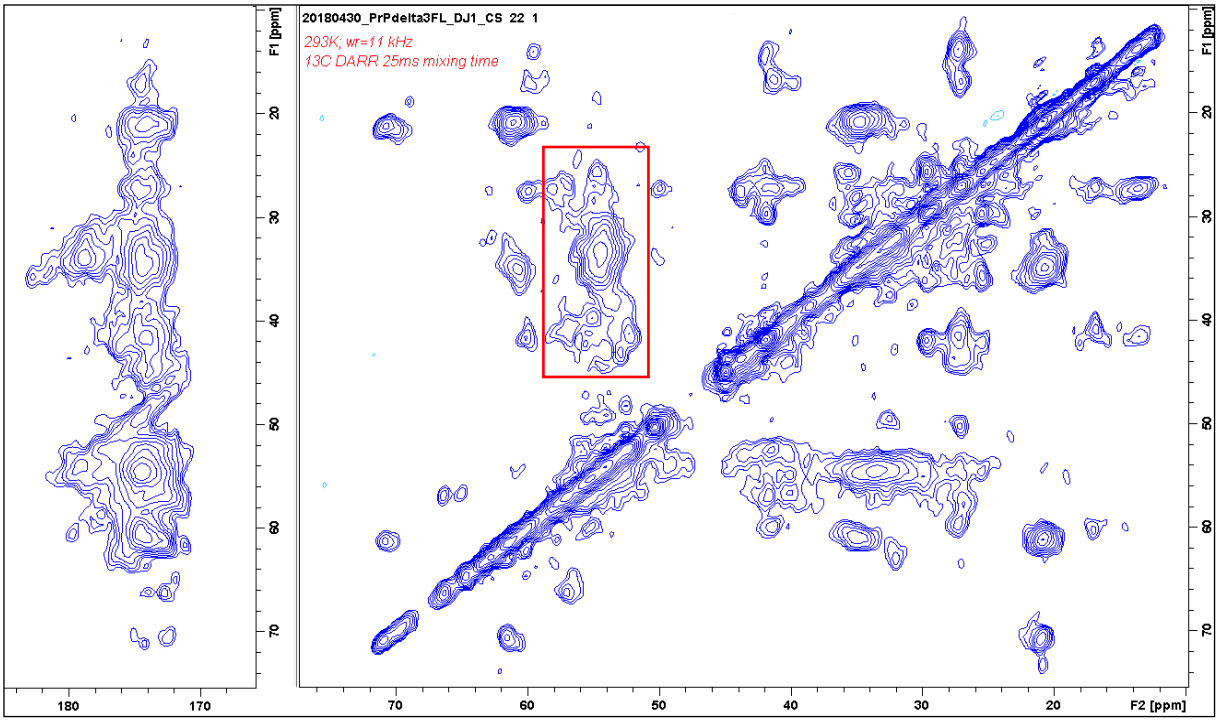

Figure 13 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196. Expérience DARR avec un temps de mélange de 25 ms. Fréquences de Larmor : ^{13}C 175.8 MHz, ^{1}H 699.3 MHz. Vitesse de rotation à l'angle magique 11 kHz. Température 293 K. Ce spectre montre les régions des carbones carbonyles (170-180 ppm) et aliphatiques (10-70 ppm) dans la dimension d'acquisition directe et la région des carbones aliphatiques dans la dimension d'acquisition indirecte. Le carré indique une région à forte superposition de signal.

L'attribution dans ces spectres 2D présente une certaine difficulté car les signaux avec des déplacements chimiques proches se superposent. Les signaux apparaissent comme étant relativement larges. Ainsi chaque pic dans le spectre 2D peut correspondre à la contribution d'un ou de plusieurs résidus. Dans certains cas, l'ajout d'une troisième dimension permet de résoudre les superpositions, mais cela n'a pas été tenté ici. En effet, une expérience 2D dure plusieurs heures et la durée d'acquisition d'une expérience 3D aurait été trop longue. Avec les données disponibles nous pouvons donc uniquement repérer des systèmes de spin qui correspondent à un type d'acide aminé : en effet pour chaque type d'acide aminé on peut définir un jeu de déplacements chimiques qui correspond aux différents atomes de carbone de la chaîne latérale. Des systèmes de spins ont été trouvés pour presque tous les types d'acides aminés

potentiellement présents dans la partie rigide. Le résultat de l'attribution est résumé dans les Tableau 2 et Tableau 3.

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	Sur un des 2 sytéme	CA-CG2	x
Ser	Oui	x	x	x
Arg	Oui	Chaine laterale	CA	x
Lys	Oui	x	CA	x
Val	Oui	x	CA-CG2	x
Ala	Oui	x	x	x
Pro	Oui	x	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Trp	Probable	Oui	Oui	x
Gln	x	x	Oui	Possible
Asn	Oui	x	x	x
Asp	Oui	x	Partielle	x
Glu	Oui	x	Oui	x
Ile	Oui	x	x	x
Cys	Possible	x	Oui	Possible
His	Possible	Oui	Oui	x
Phe	x	x	x	Oui
Tyr	Possible	Oui	x	x
Met	Possible	CE	CA	Possible
Leu	x	x	x	Oui

Tableau 2 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres DARR de PrPrec Δ190-196**.**

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	x	CA-CG2	x
Ser	Oui	x	x	x
Arg	Oui	Partielle	Partielle	x
Lys	Oui	x	Partielle	x
Val	Oui	x	CA-CG2	x
Ala	Oui	x	Possible	x
Pro	Oui	Partielle	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Trp	x	x	x	Oui
Gln	x	x	Oui	Possible
Asn	Oui	x	x	x
Asp	Oui	x	x	x
Glu	Oui	x	Oui	x
Ile	Oui	x	x	x
Cys	x	x	Oui	Possible
His	Possible	Oui	Oui	x
Phe	x	x	x	Oui
Tyr	Oui	Oui	x	x
Met	Possible	CE	CA	Possible
Leu	Oui	x	Partielle	x

Tableau 3 : Systèmes de spins trouvés pour le spectre DARR avec un temps de mélange 200 ms de fibres de PrP Δ190-196.

Une certaine ambiguïté d'attribution subsiste cependant pour certains signaux. Cette ambiguïté est soit due à un signal trop faible ou à une superposition de signaux. En effet dans certain cas

la majorité ou une partie des pics d'un système de spin sont indétectables, car les intensités sont trop faibles. C'est le cas dans les chaînes latérales qui gardent de la flexibilité : dans ce cas le couplage dipolaire est faible. Ce phénomène a été observé pour les pics correspondant aux carbones des chaîne latérales d'arginine et de tyrosine, pour le méthyle de la méthionine (CE) et pour les corrélations entre carbones CA-CD de proline. De plus aucun signal correspondant aux systèmes de spin des résidus phénylalanine et tryptophane n'est détectable sur le spectre DARR avec un temps de mélange de 200 ms.

L'ambiguïté liée à une superposition de signaux concerne au moins une partie du système de spin pour la majorité des types d'acides aminés attribués. Ceci est particulièrement visible autour de 55 ppm car de nombreux carbones CA de différents résidus donnent un signal dans cette région (**Figure 13**). Les résidus qui ne sont pas concernés par cette ambiguïté sont ceux des acides aminés thréonine, sérine, proline et isoleucine (et asparagine dans une moindre mesure), car les déplacements chimiques correspondant aux différents carbones de leur chaîne latérale sont très caractéristiques et donc facile à distinguer (exemple de la sérine dans la **Figure 14**).

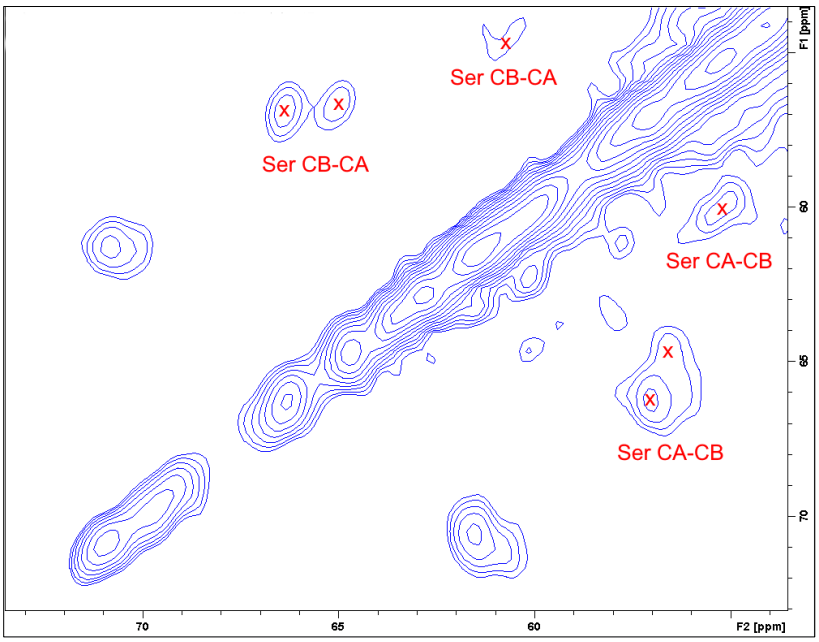

Figure 14 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 (Figure 13) sur la région de corrélation entre atomes CA et CB des sérines.

Pour les autres résidus la plupart du temps il est possible en identifiant des pics situés dans des régions peu peuplées du spectre de reconstituer le système de spin correspondant au résidu : un exemple est donné avec l'interaction CE-CB de la lysine.

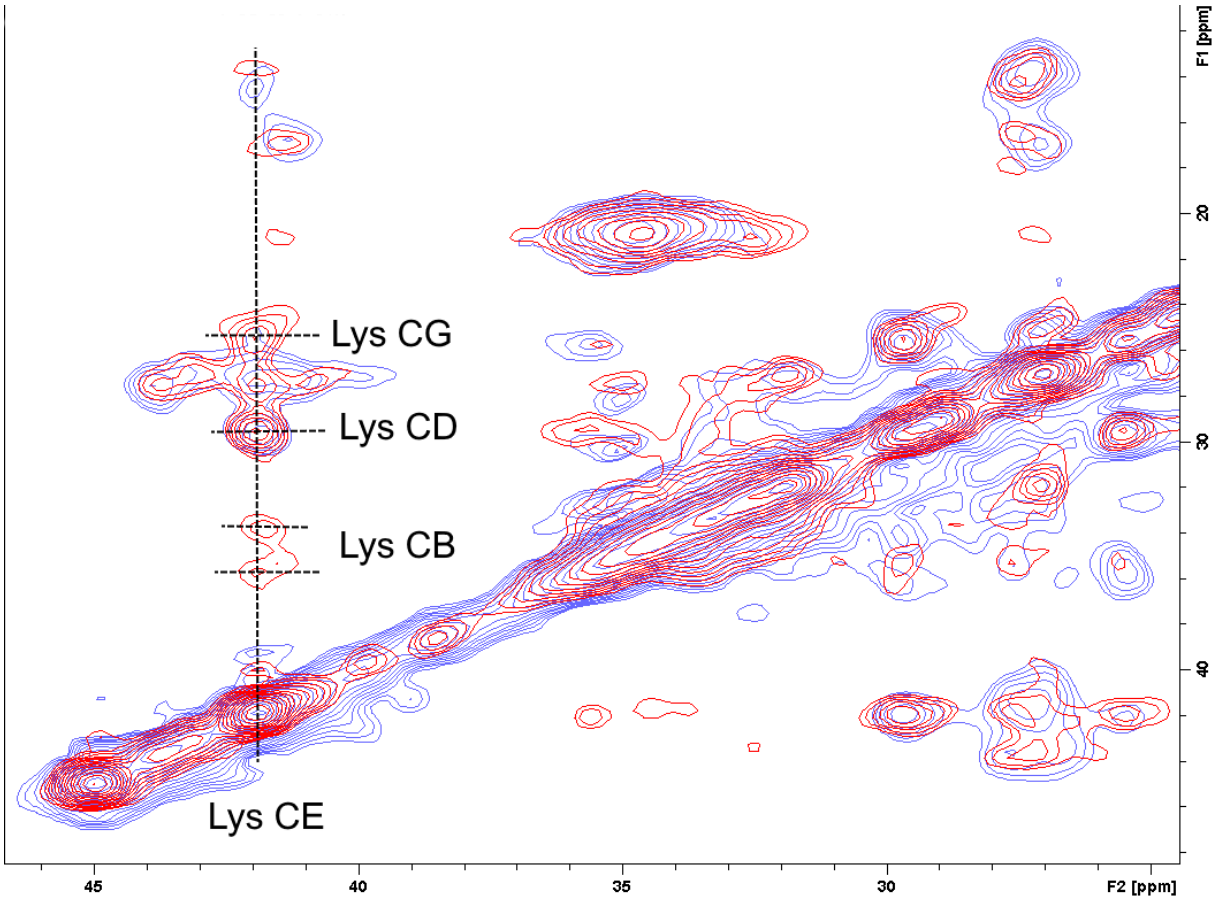

Figure 15 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 (Figure 13) sur la région de corrélation entre atomes CE et CB de lysines.

Dans d'autre cas un pic du système de spin se superpose à un autre pic, mais sans gêner l'attribution : dans la **Figure 16** on observe que le pic correspondant à la corrélation CB-CG2 de la thréonine est caractéristique et donc facile à identifier. Dans ce cas la superposition du pic de la corrélation CA-CG2 de la thréonine avec celui de la corrélation CA-CB de la valine ne gêne pas l'attribution système de spin thréonine.

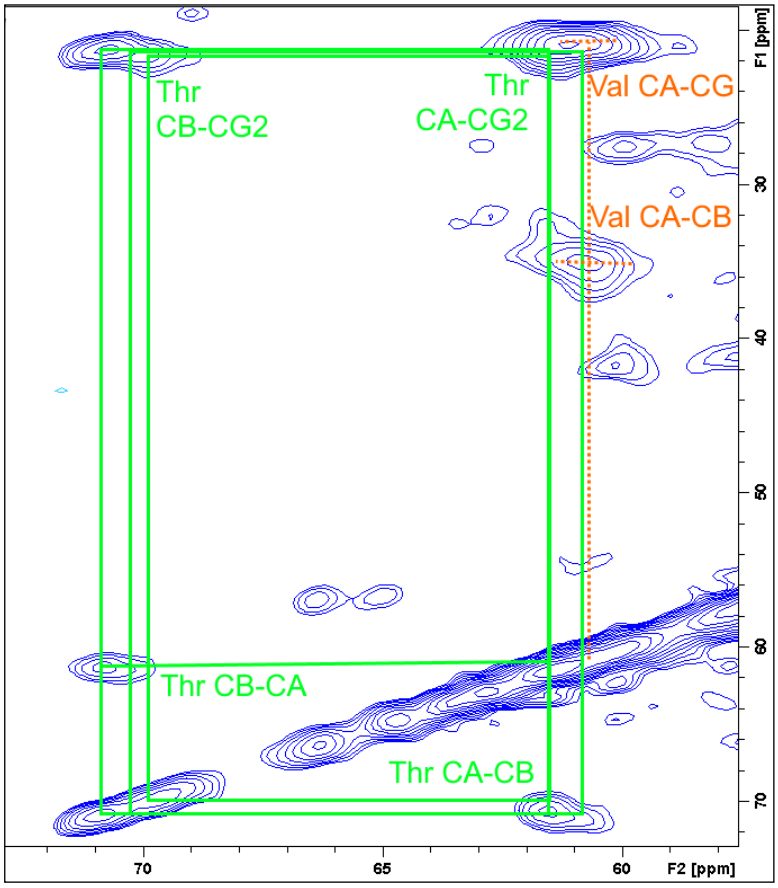

Figure 16 : Zoom du spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 (Figure 13) sur la région de corrélations CB- CG2 et CA-CG2 des thréonines et CA-CG des valines.

Au cours de l'attribution j'ai parfois observé différents systèmes de spin correspondant à un même type de résidu. Cette information suggère que des résidus de même type se trouvent dans des environnements différents qui influent sur leur déplacement chimique. On retrouve ce phénomène dans la **Figure 14** où il est possible d'observer 3 systèmes de spin différents correspondant à des sérines. J'ai aussi remarqué que les pics correspondant aux valines sont en plus d'être intenses particulièrement étendus (**Figure 16**) ce qui coïncide avec le fait que les valines sont distribuées dans différentes régions de la partie présumée rigide des prions et qu'elles sont de ce fait potentiellement exposées à différents environnements.

En comparant les spectres obtenus avec un temps de mélange court (25 ms) et avec un temps de mélange long (200 ms), on observe une superposition de la majorité des pics (**Figure 17**). Le spectre à 25 ms présente des pics plus fins et plus intenses probablement grâce à une relaxation nucléaire moins efficace qu'à 200 ms. Ainsi certains pics disparaissent à 200 ms. Nous observons la disparition d'un pic correspondant à un des systèmes de spin de thréonine

(**Figure 17**). Pour la serine le signal situé à 60,8 x 57,4 ppm semble conservé, mais pas les autres (**Figure 17**).

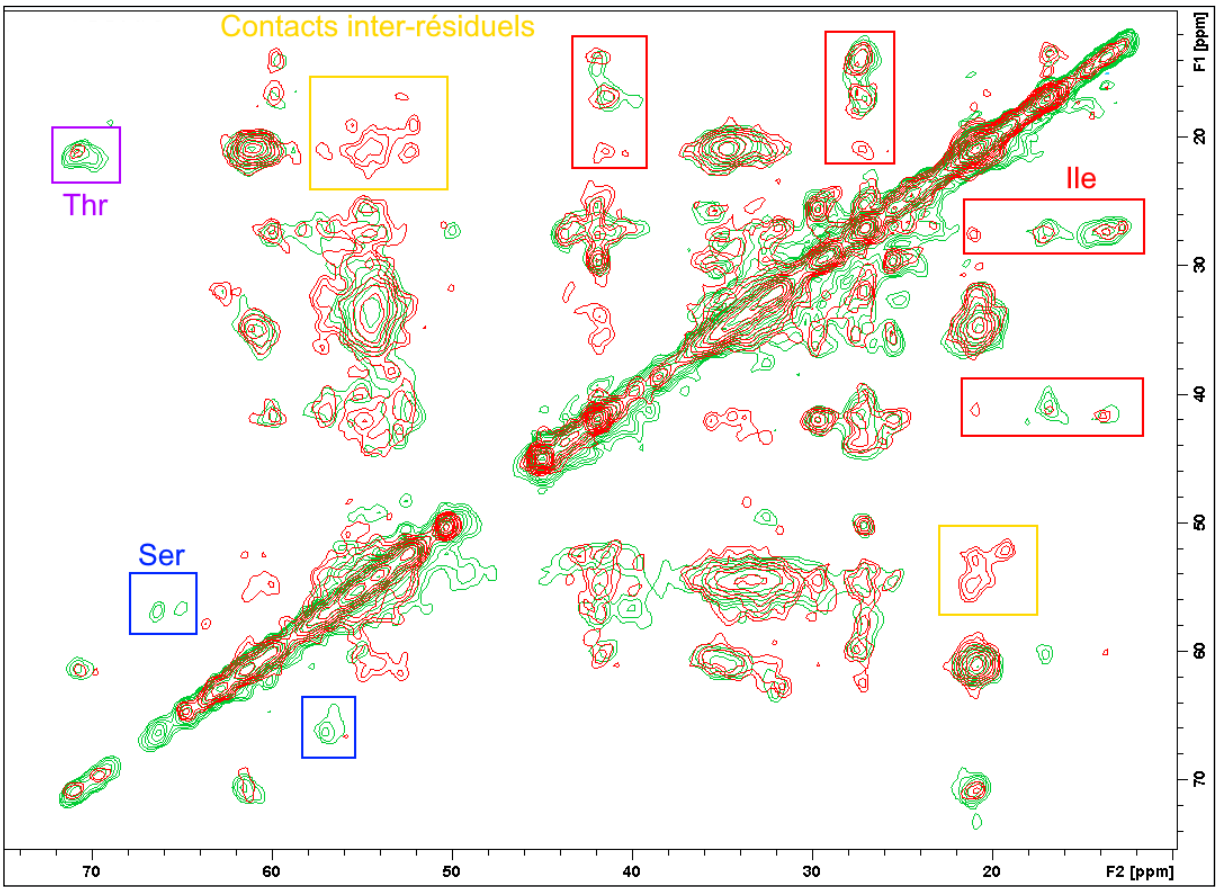

Figure 17 : Superposition de spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR de fibres PrPrec Δ190-196 avec deux temps de mélange différents, 25 ms (en vert) et 200 ms (en rouge). Fréquences de Larmor : ^{13}C 175.8 MHz, ^{1}H 699.3 MHz. Vitesse de rotation à l'angle magique 11 kHz. Température 293 K. Seule la région aliphatique est montrée.

Le spectre à 200 ms comporte des pics supplémentaires ou plus intenses, correspondant à des distances plus grandes. Cela peut correspondre aux contacts à plus longue distance au sein d'une même chaîne latérale (par exemple entre CA et CD ou CG2 dans l'isoleucine, **Figure 17**) ou à un contact entre les chaînes latérales de deux acides aminés différents quand les combinaisons de déplacements chimiques ne correspondent pas à un seul acide aminé (carrés jaunes dans la **Figure 17**).

On notera aussi la présence de pics correspondant aux chaînes latérales de tryptophanes et tyrosine dans le spectre à 25ms, mais pas dans celui à 200ms. Ceci est probablement lié à un meilleurs rapport signal sur bruit pour les temps de mélange courts (**Figure 18**).

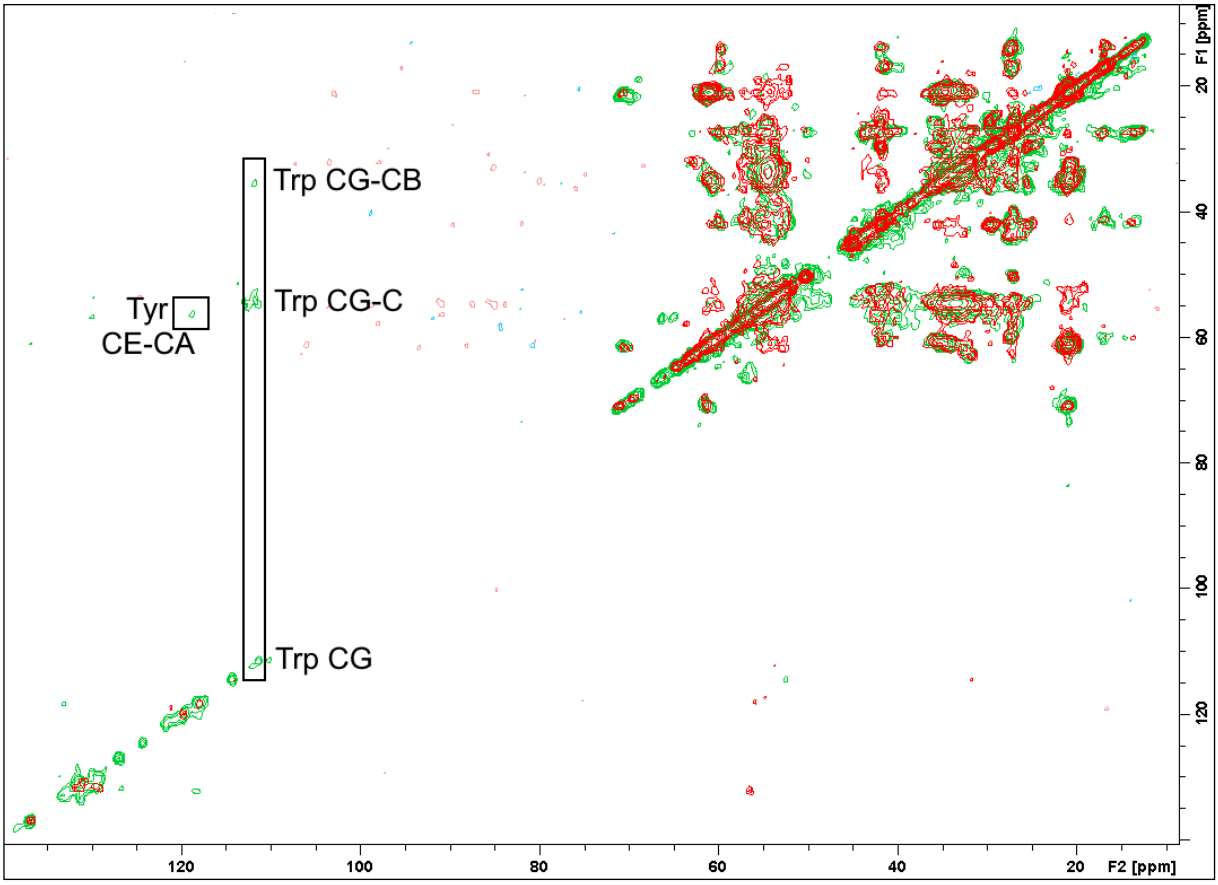

Figure 18 : Spectres 2D DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 avec des temps de mélange à 25 ms (en vert) et 200 ms (en rouge) montrant les régions aromatiques et aliphatiques, avec la mise en évidence d'un système de spin appartenant probablement à un tryptophane.

2.2. Analyse des régions flexibles des fibres amyloïdes de PrPΔ190-196 par RMN du solide

Les données par microscopie à force atomique (AFM) semblent indiquer une partie rigide centrale et une partie flexible périphérique exposée au solvant (**Figure 19**).

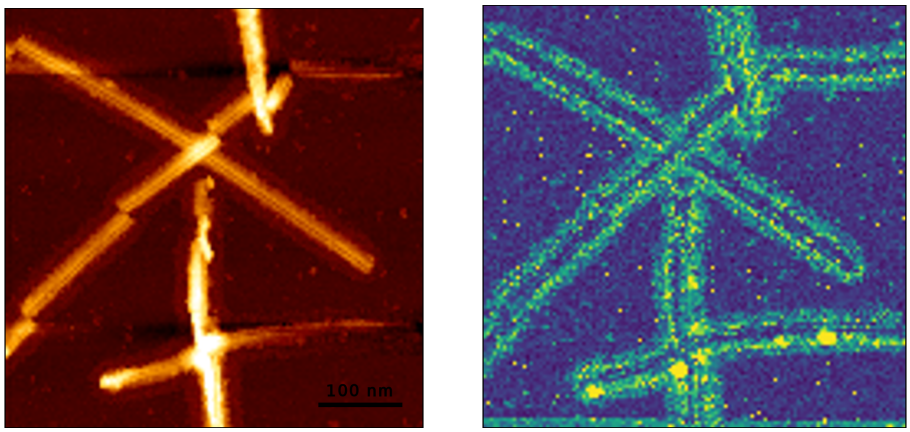

Figure 19 : Images AFM de PrPrec Δ190-196 montrant un cœur rigide entouré des parties flexibles.

Le même échantillon de fibres amyloïdes de PrP recombinantes pleine longueur Δ190-196 a donc été analysé avec une séquence permettant d'obtenir des corrélations 13C-13C à l'aide couplages scalaires : l'expérience TOtal through Bond correlation SpectroscopY (TOBSY) donne un spectre homonucléaire 2D présenté dans la **Figure 20**. Il permet d'observer les parties flexibles qui ont des vitesses de relaxation nucléaires plus faibles que les parties rigides. Ainsi le signal des parties rigides n'apparaît pas dans ce spectre. Le spectre TOBSY permettrait donc d'observer les signaux correspondants à la partie périphérique observée par AFM, mais pourrait aussi mettre en évidence les signaux d'éventuelles régions flexibles dépassant du corps rigide des fibres.

En comparaison avec le spectre DARR, le spectre TOBSY arbore des pics plus fins, moins étendus et mieux résolus, particulièrement dans la région autour de 55 ppm **(Figure 21)** qui comprend beaucoup de superposition dans le DARR. De façon générale les pics sont plus intenses notamment dans la région entre 100 et 150 ppm où se trouvent les signaux correspondant aux noyaux aromatiques. Nous observons aussi entre les deux spectres un décalage des déplacements chimiques des signaux CA-CB pour un certain nombre de résidus :

comme les déplacements chimiques du squelette peptidique sont sensibles aux structures secondaires, ces déplacements chimiques suggèrent que des acides aminés de même nature ont des structures secondaires différentes dans les parties flexibles et les parties rigides

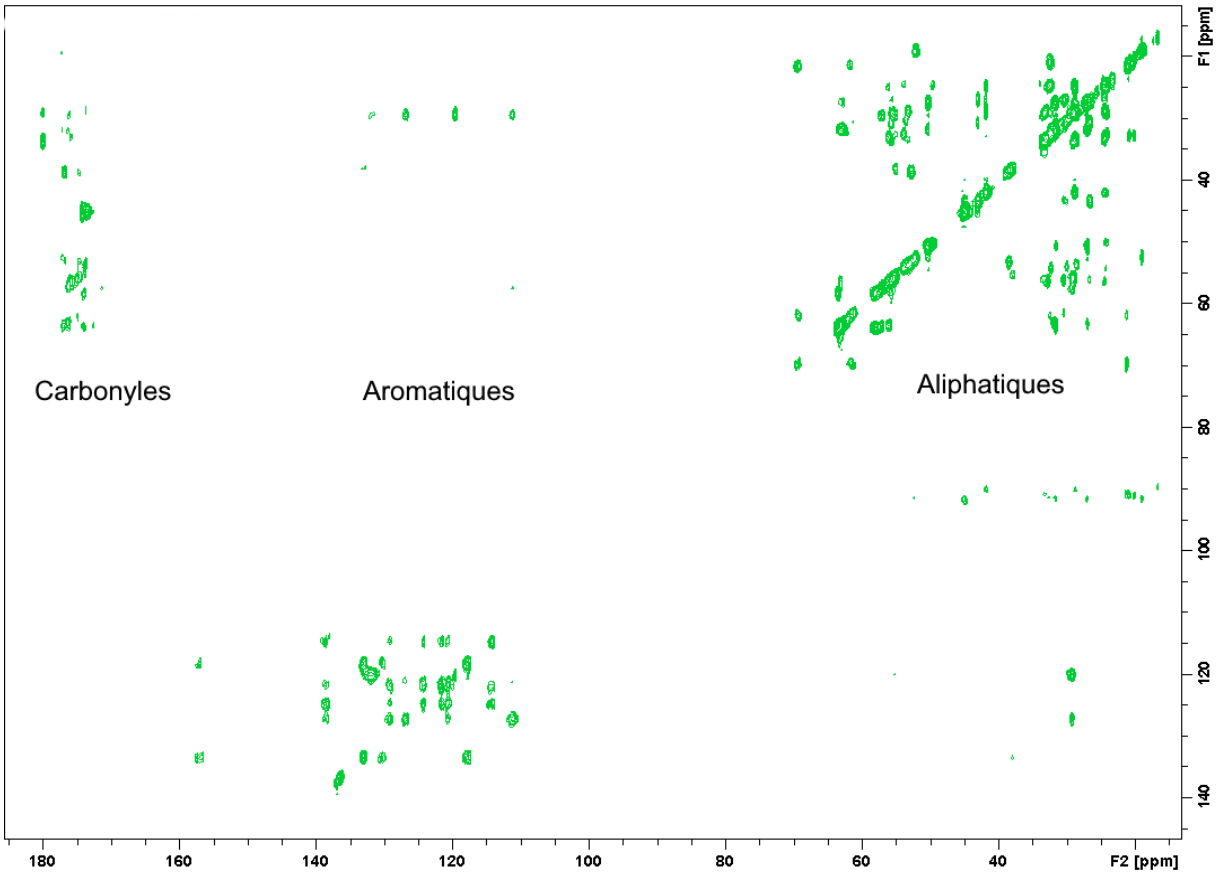

Figure 20 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage scalaire de fibres de PrPrec Δ190-196. Expérience TOBSY avec un temps de mélange de 6.17 ms. Fréquences de Larmor : ^{13}C 175.8 MHz, ^{1}H 699.3 MHz. Vitesse de rotation à l'angle magique 10.2 kHz. Température 293 K. Ce spectre montre la région allant des carbonyles (170-180 ppm) aux carbones aliphatiques (10-70 ppm) en passant par les carbones aromatiques (100-160 ppm) dans la dimension d'acquisition directe et la région des carbones aliphatiques et aromatiques dans la dimension d'acquisition indirecte.

Le choix a été fait de d'acquérir un spectre TOBSY en 2D. Une dimension ^{1}H aurait pu être ajoutée. En l'absence d'une troisième dimension, les signaux avec des déplacements chimiques proches se superposent. Ainsi chaque pic du spectre peut correspondre à la contribution d'un ou de plusieurs résidus. Donc cette fois encore, avec le jeu de donnée disponible, nous ne pouvons qu'attribuer à chaque système de spin le type d'acide aminé correspondant et non pas un résidu particulier dans la séquence protéique. Presque tous les signaux ont pu être attribués à des résidus censés être présents dans la partie flexible. Le résultat de l'attribution est récapitulé dans le Tableau 4.

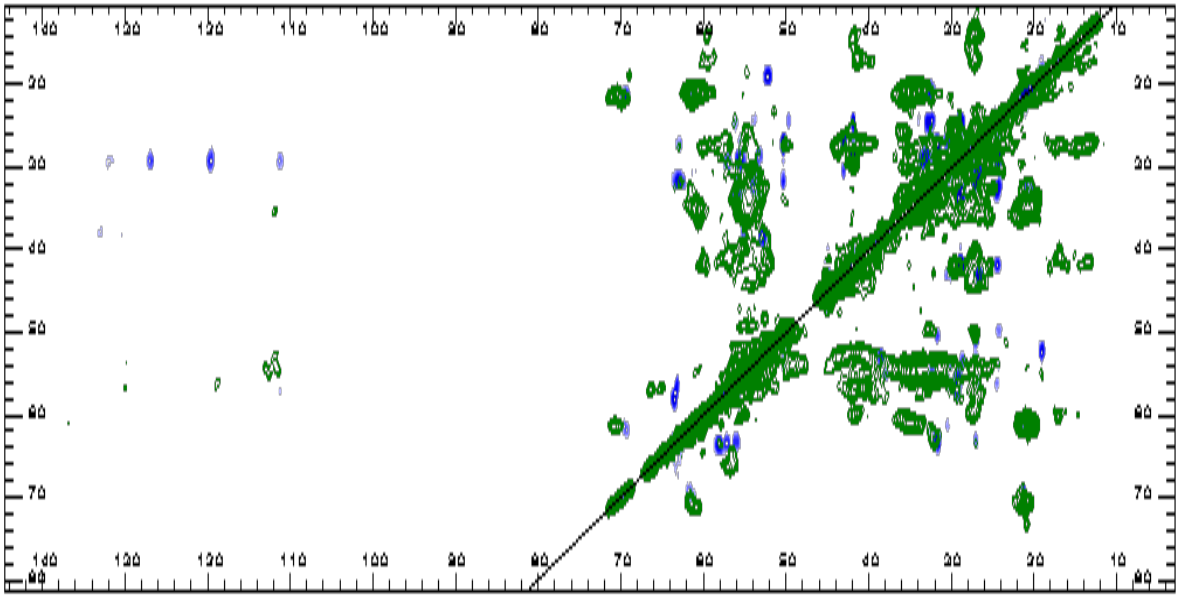

Figure 21 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR (Figure 13) et TOBSY (Figure 20) de fibres de PrPrec Δ190-196.

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	x	x	x
Ser	Oui	x	x	x
Arg	Oui	Partielle	x	x
Lys	Oui	Partielle	Partielle	x
Val	Oui	CA-CG2	CA-CB	x
Ala	Oui	x	x	x
Pro	Oui	CA-CD	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Trp	Oui	Chaine laterale	x	x
Gln	Oui	x	x	x
Asn	Oui	x	x	x
Glu	Oui	x	Oui	x
His	x	x	x	Oui
Tyr	Oui	Chaine laterale	x	x
Met	x	x	x	Oui

Tableau 4 : Systèmes de spins trouvés pour le spectre TOBSY de fibres de PrPrec Δ190-196

Une perte d'une partie des signaux du système de spin a été observée pour les corrélations CA-CD pour la proline, CA-CG2 pour la valine, CA-CD pour l'arginine et pour les pics correspondant aux carbones des chaîne latérales des tyrosines, tryptophanes et arginines. Une partie du système de spin correspondant aux lysines est absente du spectre, mais suffisamment de signaux sont présents pour permettre l'attribution. Les signaux correspondants aux histidines et aux méthionines semblent absents du spectre : ces deux acides aminés n'ont donc pas été attribués.

Contrairement au spectre DARR, l'ambiguïté de superposition est très faible dans le spectre TOBSY et ne concerne que la corrélation CA-CB de la valine. Cette dernière, bien que possible, reste potentiellement absente étant donné que le CA de la valine semble donner un signal très faible.

Nous avons parfois observé différents systèmes de spin correspondant à un même type de résidu. Fait intéressant, la résolution des spectre TOBSY nous a permis d'attribuer les carbonyles de certains résidus mettant parfois en évidence la présence de plusieurs systèmes de spins qui seraient autrement passé inaperçus. On observe 2 systèmes de spin pour les acides aminés asparagine et sérine. Pour les lysines il semble y avoir 2 à 3 systèmes de spin avec des déplacements chimiques très différents (**Figure 22**).

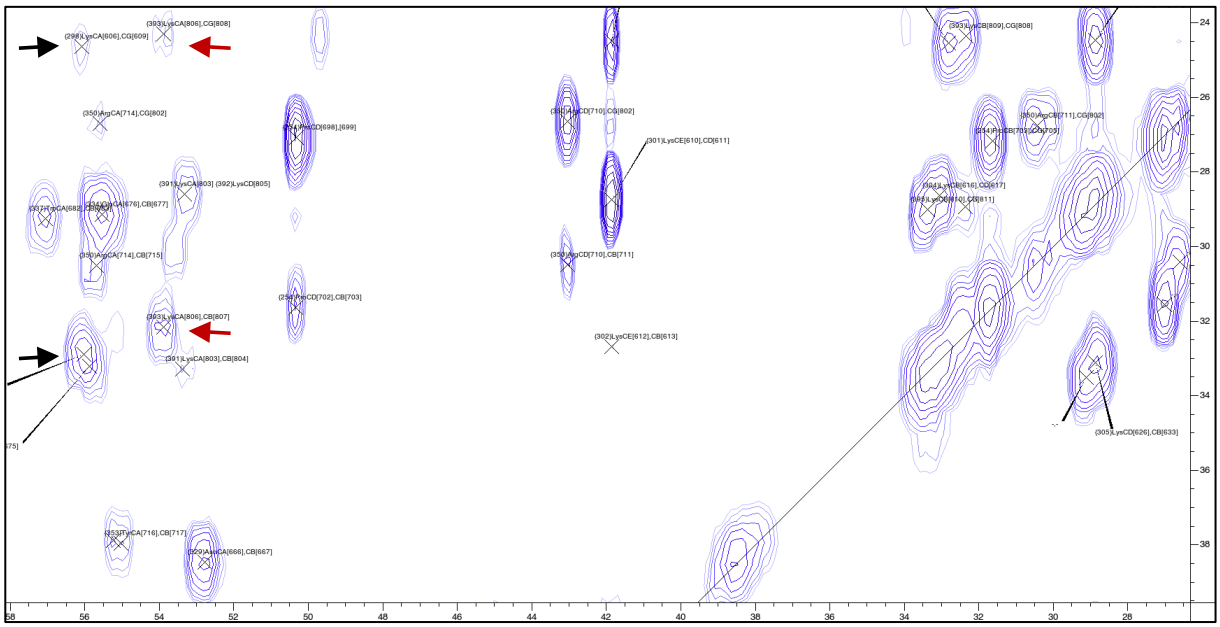

Figure 22 : Zoom sur le spectre TOBSY de fibres de PrPrec Δ190-196 (Figure 20). Les flèches rouges et noires pointent vers 2 systèmes de spins différents correspondant à des lysines.

La présence de signaux dus à des alanines et potentiellement à des valines est inattendue (**Figure 23**). En effet dans la séquence de la PrP ovine le premier résidu alanine est à la position 116 et le premier résidu valine à la position 115. Ces résidus sont donc présents dans la partie prion, mais semblent présenter une certaine flexibilité.

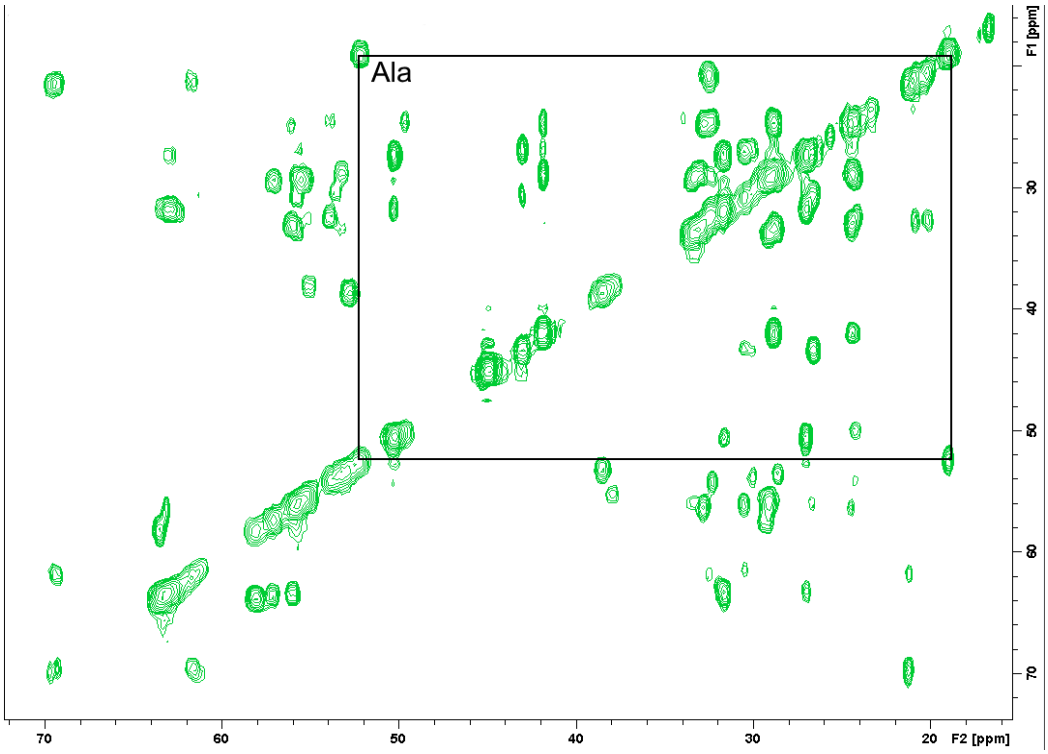

Figure 23 : Identification d'un système de spin d'alanine sur le spectre TOBSY de fibres Δ190-196.

2.3. Approches visant à réduire l'hétérogénéité structurale des fibres de PrPΔ190-196

L'analyse par RMN du solide des fibres amyloïdes de PrP recombinante pleine longueur Δ190-196 a abouti à des signaux RMN relativement larges en carbone 13. Des essais ont été faits pour acquérir une dimension azote 15 : mais il a été impossible d'obtenir des spectres de corrélation ^{15}N-^{13}C avec une bonne résolution en azote 15. La raison de l'élargissement des signaux RMN qui nous paraît la plus probable est la présence d'une hétérogénéité structurale importante au sein de l'échantillon. Un échantillon homogène permettrait d'obtenir des signaux RMN plus fins et d'envisager une attribution des déplacements chimiques de résidus spécifiques dans la séquence protéique, ce qui est un prérequis pour obtenir des informations structurales plus précises sur ces fibres. Nous avons donc tenté de réduire cette hétérogénéité par le biais de trois stratégies.

1. La réduction de la séquence de la PrP recombinante.
2. Une sélection cinétique par seeding des fibres se répliquant le plus rapidement.
3. Une sélection des structures les plus résistantes par maturation (annealing) et traitement PK.

2.3.1. Homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196 par amorçage « seeding »

Comme décrit précédemment, dans des conditions standards, la formation spontanée de fibres amyloïdes de PrP *in vitro* se fait en deux étapes : une 1ère étape limitante dite de nucléation qui consiste en la formation spontanée du noyau de départ, suivie d'une 2^{éme} étape d'élongation plus rapide. Cependant pour les fibres de PrP comme pour beaucoup d'autres fibres amyloïdes il est possible d'introduire une amorce (seed) au début de la fibrillation, ce qui permet une élongation directe sans passer par l'étape de nucléation. Cette approche dite d'amorçage ou « seeding » est à la base de la technique « QuIC » (Quaking-Induced Conversion). Elle permet d'augmenter la vitesse de fibrillation et éventuellement d'aboutir à une ou des nouvelles structures grâce à la contrainte imposée par l'amorce.

L'utilisation de l'amorçage dans le but de réduire l'hétérogénéité structurale des fibres de PrPΔ190-196 nous confronte à deux problématiques. Premièrement nous devons trouver des

conditions permettant de privilégier la fibrillation induite par l'amorce par rapport à celle de la fibrillation spontané. Or la phase de latence pour la formation des fibres de PrPΔ190-196 est déjà courte dans les conditions standard, très réduite par rapport à celle de la PrP sauvage. Deuxièmement la structure sélectionnée doit être thermodynamiquement stable afin d'éviter que son évolution au cours du temps recrée une diversité structurale.

Nous avons choisi un moyen de sélection afin de déterminer quelle structure répliquer au travers des différents passages. Nous avons décidé de sélectionner à chaque passage l'espèce la plus favorable cinétiquement afin qu'elle capture rapidement le substrat (PrP recombinante) disponible empêchant ainsi par compétition le développement des autres espèces structurales. Le but étant qu'après un certain nombre de passage le système converge vers une population de structures moins importante.

Dans une première expérience nous avons tenté de rendre les conditions de fibrillation plus stringentes en réduisant la concentration du substrat (PrP recombinante) à 11 µM ou 5,5µM (22µM dans la condition standard usuelle) et en supprimant l'agent chaotropique (GdHCl) afin de limiter la fibrillation spontanée. L'amorçage correspondant à l'addition de 10% de fibres Δ190-196 déjà formées dans une expérience précédente. Avec ces conditions peu favorables, nous avons observé une fibrillation lente et peu efficace en comparaison aux conditions standards comme on pouvait s'y attendre, mais pas de différence notable dans la cinétique ou l'efficacité en présence ou non d'amorce. **(Figure 24)**.

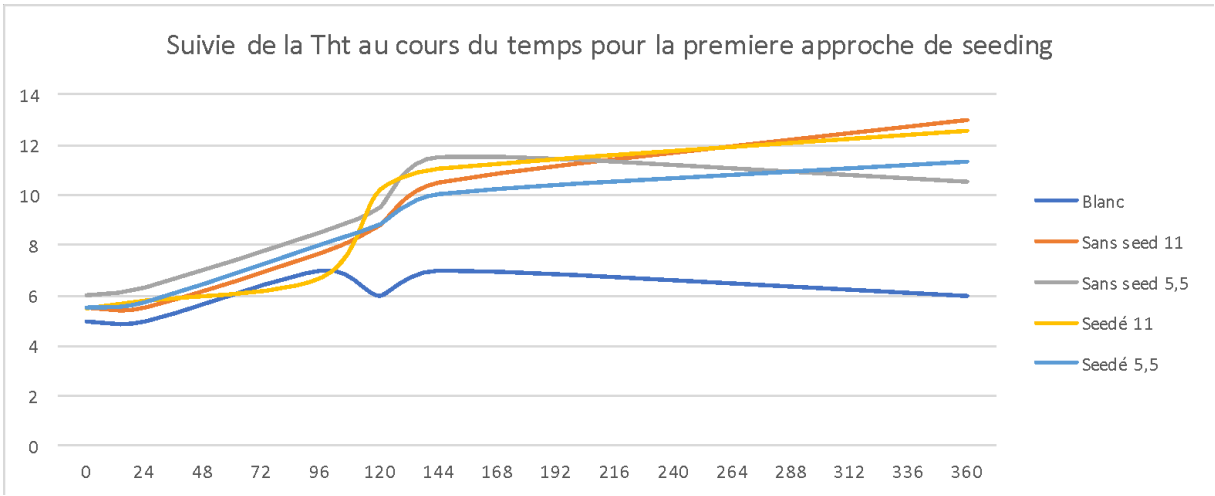

Figure 24 : Suivi par fluorescence de la Thioflavine T de la formation de fibres de PrPΔ190-196 en absence de GdHCl, en fonction de la présence d'amorces.

Notre deuxième approche a consisté à conserver les conditions de fibrillation standard tout en cumulant les passages. Les fibres sont récupérées après 16 h de fibrillation quand elles sont encore dans leur phase exponentielle de croissance pour servir d'amorce à une nouvelle fibrillation. Le processus a été répété 6 fois. La Figure 13 résume la fluorescence ThT obtenue après 16 h de fibrillation pour chaque passage. Dans ces conditions nous n'observons pas de sélection cinétique qui devrait se traduire par une augmentation de la vitesse de fibrillation.

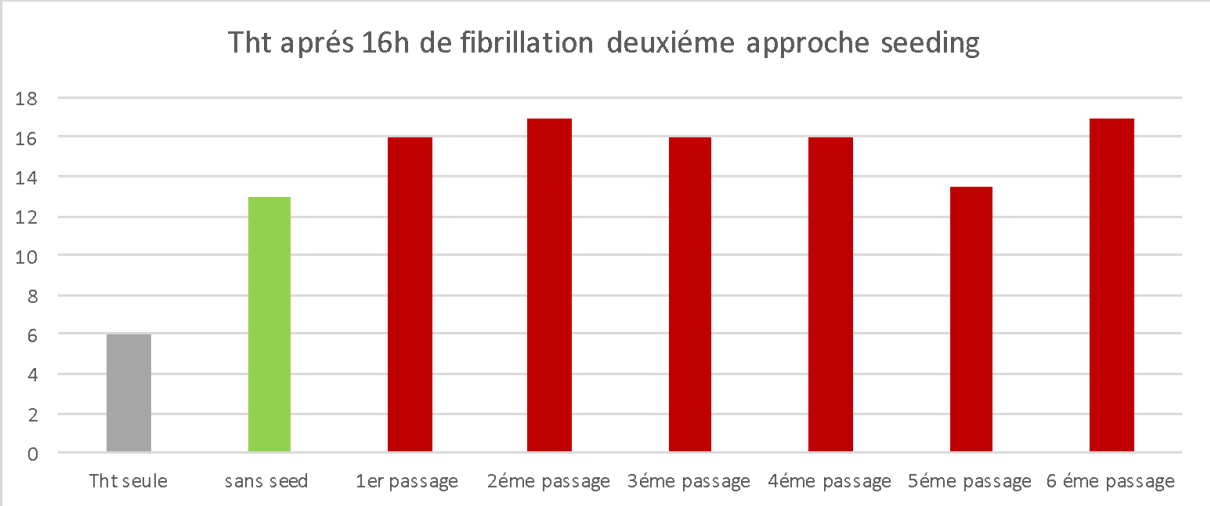

Figure 25 : Intensité de la fluorescence (ThT) des fibres de PrPΔ190-196 formées dans des conditions standards au bout de 16 h de réaction.

Pour notre troisième et dernière approche nous avons décidé de modifier le mode d'agitation. Tout en conservant la concentration en protéine (22µM) et le tampon utilisé dans les conditions standard (avec 2M GdHCL), mais nous avons effectué la fibrillation sur une plaque de 96 puits sous une agitation orbitale continue de 240 rpm sur un lecteur de plaque SAFAS. Ces conditions se sont avérées particulièrement discriminantes. En effet comme le montre la **Figure 26**, sur les 20 puits ne contenant pas d'amorce aucun n'a initié de fibrillation spontanée même après 5 jours d'agitation. Par contre sur les 10 puits contenant une amorce, 6 ont initié une fibrillation efficace et avec des temps de latences parfois très réduits. Ces conditions sont donc les plus adaptées à notre approche de sélection cinétique par amorçage.

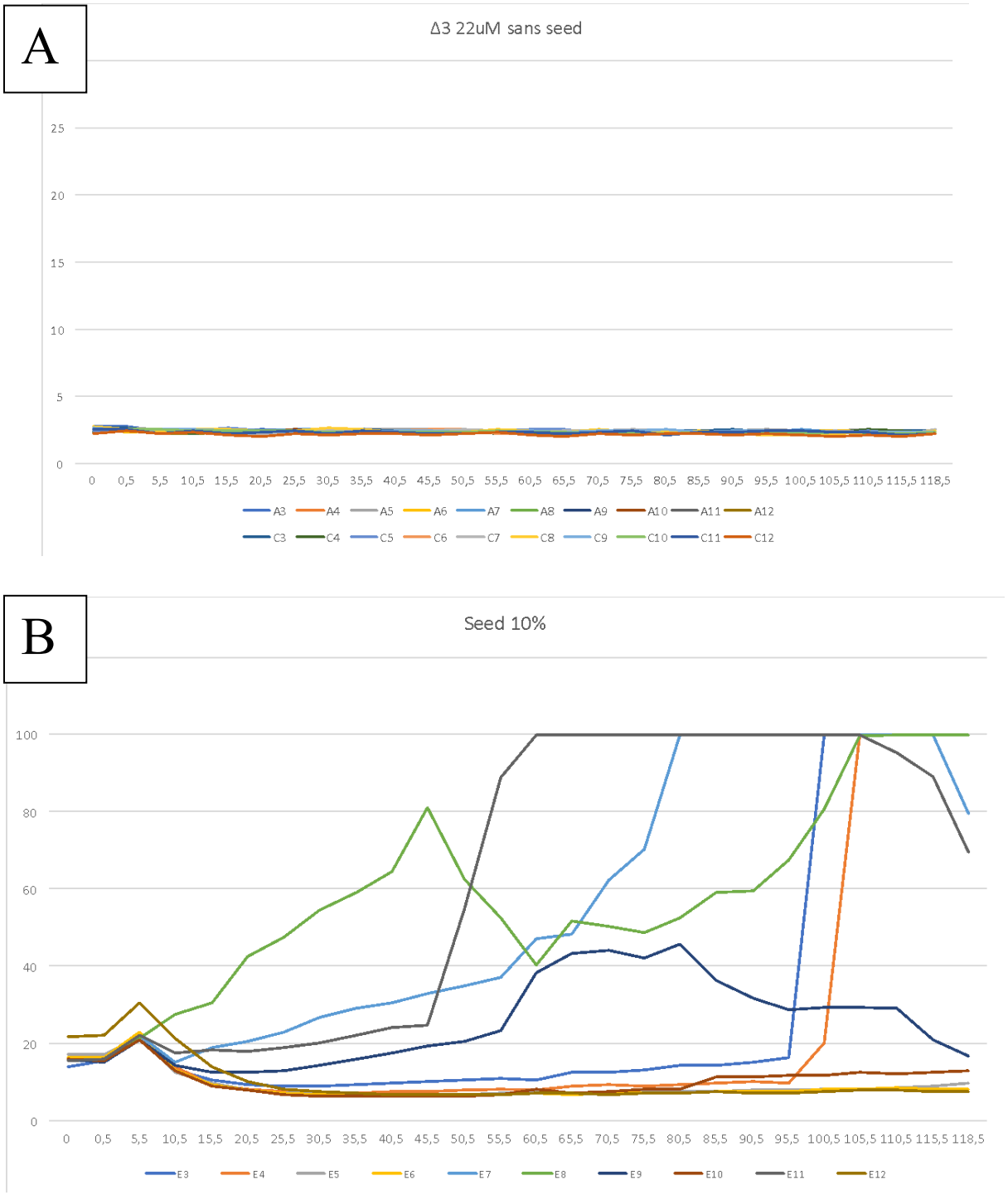

Figure 26 : Suivi par fluorescence de la ThT de la formation de fibres de PrPΔ190-196 sous agitation, A) en l'absence d'amorce et B) en présence de 0.2µM d'amorces.

2.3.2. Homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196 par maturation « annealing »

Tout comme les prions, les fibres amyloïdes de PrP recombinantes possèdent une certaine résistance aux protéases. Bien que les fibres soient apparemment et globalement moins résistantes que la plupart des souches de prion leur résistance peut être augmentée par simple incubation en présence de détergent grâce à un procédé appelée maturation ou « annealing » (décrit dans l'introduction de la partie 3).

Nous avons utilisé un traitement au triton suivi d'une digestion à la PK afin de sélectionner une structure ou une population de structures, dans l'optique d'améliorer les signaux RMN. Sur la Figure 27 nous observons une augmentation significative de la résistance à la PK des fibres après incubation en présence de 1 % de triton X-100 pendant 1 h à 37°C. Avec un ratio PK:PrP de 1:50 le pourcentage de fibres résistantes à la PK passe de 7 % en absence de traitement à 20 % après maturation. Nous observons aussi un effet de la température : ainsi une incubation d'une heure à 70°C permet d'obtenir 38 % de fibres résistante avec un ratio PK:PrP de 1:50.

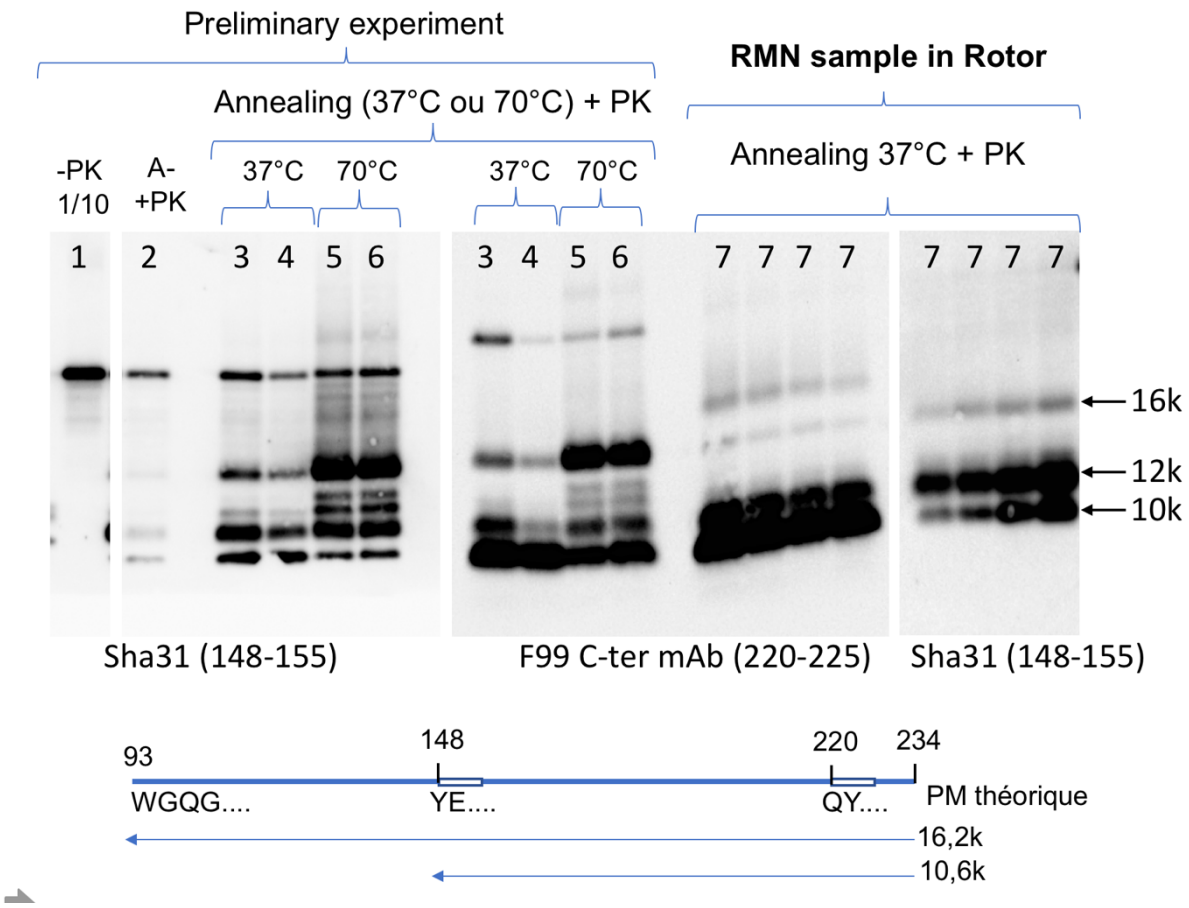

Figure 27 : Test des échantillons maturés au Triton et traités PK révélés avec l'anticorps C-term F99.

Dans une expérience préliminaire une suspension de fibres de PrP pleine longueur (25-234) a été utilisée (échantillons 1 à 6). Dans le puits 1 Les fibres sont laissées sans traitement et la quantité de fibre déposée correspond à seulement 10% de celle déposée pour les fibres traitées PK (2 à 6). Les fibres ont été digérées par la PK sans annealing préalable (échantillon 2), ou après annealing avec 1% triton X100 à 37°C (échantillons 3 et 4) ou à 70°C (échantillons 5 et 6). L'échantillon qui a été utilisé pour la RMN (7) est déposé en quatre exemplaires et révélé par F99 sur le panneau central et Sha31 sur celui de droite.

Ces résultats suggèrent que la maturation en présence de triton permet un remaniement structural d'une partie des fibres qui les rend plus résistantes à la PK. Cette propriété pourrait donc permettre la sélection d'une population de structures tout en éliminant les parties flexibles.

2.4. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes du fragment 113-234 de PrPΔ190-196 recombinante par RMN du solide

Parmi les approches sélectionnées dans le but de réduire l'hétérogénéité structurale de nos fibres nous avons tenté de réduire la séquence de la PrP. En effet, en théorie, en absence de toute contrainte le nombre de conformères que peut aborder une protéine dans l'espace est directement proportionnel à sa séquence. Cependant en réalité le nombre de structures thermodynamiquement stables qu'elle peut adopter est très inférieur au nombre de conformères théoriquement possibles. En fonction des caractéristiques physicochimiques de la macromolécule, une séquence courte peut potentiellement adopter plus de structures stables qu'une séquence plus longue (David J. Wales., 2003). La possibilité que cette expérience mène à une diversité structurale encore plus importante existe donc, mais l'approche expérimentale reste à ce jour le seul moyen fiable de le vérifier.

Nous avons produit une PrP ovine tronquée correspondant à la taille du C1 (113-234) et comprenant la délétion Δ190-196. Cette PrP a permis la formation de fibres que nous avons étudiées sur le plan biologique (Partie 2), mettant ainsi en évidence leur infectiosité en cellules. Nous avons ensuite étudié ces fibres sur le plan structural par RMN du solide dans l'espoir qu'elles présentent une hétérogénéité structurale moins importante que les fibres pleine longueur.

Nous avons effectué une analyse par RMN du solide de 1,8 mg de fibres amyloïdes de PrP recombinantes C1 Δ190-196 marquées aux isotope ^{13}C et ^{15}N. Les fibres étaient conservées dans un tampon 10 mM acétate de sodium pH 5 à une concentration de 2,8 mM. A cette concentration elles se présentent sous forme de gel. Un rotor de 3.2 mm de diamètre a été rempli avec cet échantillon.

Comme pour les fibres de pleine longueur, des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage dipolaire ont été acquis avec un temps de mélange de 25 ms afin d'observer la partie rigide des fibres. La séquence DARR a été remplacée par la séquence PARIS (Weingarth et al., 2010). Toutes les mesures ont été effectuées avec rotation à l'angle magique avec une vitesse de 13 kHz à une température de 293 K. Les spectres RMN ont été acquis à une fréquence de 201.2

MHz pour le carbone 13 (^{13}C) et 800.3 MHz pour le proton (^{1}H). Un exemple de spectre de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire est donné dans la **Figure 28.**

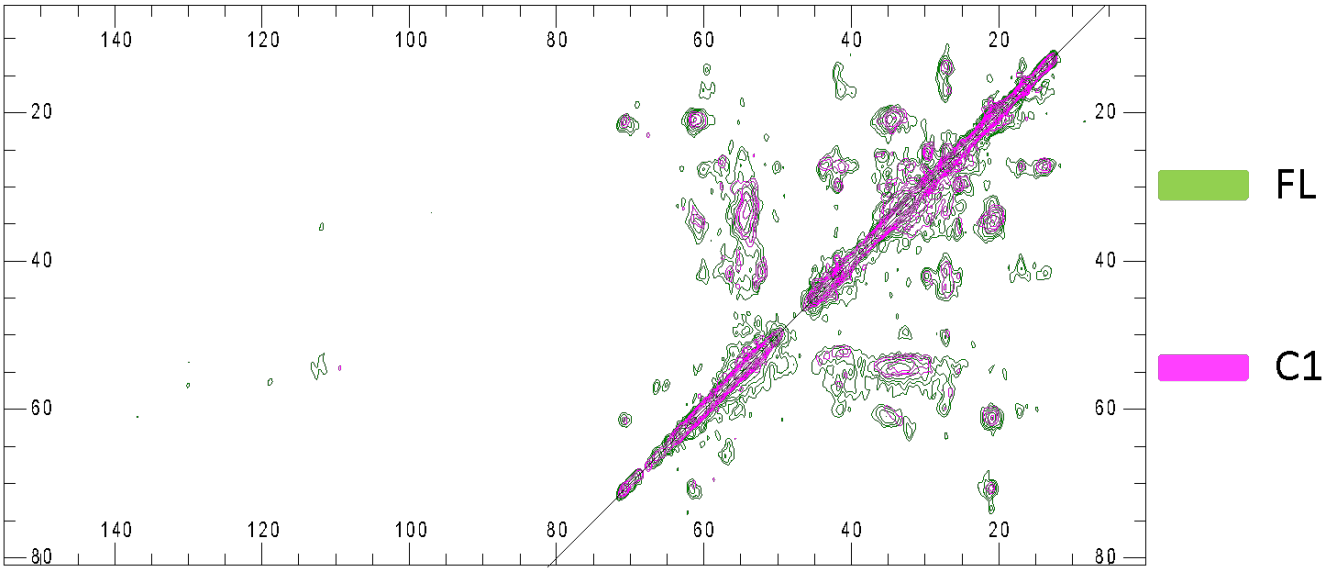

Figure 28 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 C1 et pleine longueur (FL, Figure 13). Le spectre de C1 a été acquis avec une séquence PARIS et avec des fréquences de Larmor 201.2 MHz (13C) et 800.3 MHz (^{1}H). Vitesse de rotation à l'angle magique 13 kHz.

Différents systèmes de spins ont pu être attribués à des acides aminés spécifiques (Tableau 5).

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	x	CA-CG2	x
Ser	x	x	x	Oui
Arg	Oui	Partielle	Partielle (CA)	x
lys	Oui	Partielle	Partielle (CA)	x
Val	Oui	x	CA-CG2	x
Ala	x	x	x	Oui
Pro	Oui	Partielle	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Gln	Oui	x	Oui	Possible
Asn	x	x	x	Oui
Asp	Oui	x	x	x
Glu	Oui	x	x	x
Ile	Oui	CA-CD1/CG2-CD1	x	x
Cys	x	x	x	Oui
His	x	x	x	Oui
Phe	x	x	x	Oui
Tyr	Oui	Oui	x	x
Met	x	x	x	Oui
Leu	x	x	x	Oui

Tableau 5 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres PARIS de fibres de PrPrec 113-234 (C1) Δ190-196.

Les signaux des systèmes de spin correspondant aux résidus Phe, His, Cys, Met, Ser, Ala et Asn sont trop faibles pour être détectés. Nous observons aussi l'absence d'une partie des pics des systèmes de spin des résidus Arg, Lys, Pro, Ile et Tyr.

Une superposition de signaux semble présente dans la région autour de 54 ppm qui comprend les signaux des CA des résidus Arg, Lys et Gln et comme pour les spectres précédant une superposition des signaux correspondant à la corrélation CA-CG2 des résidus Thr et Val reste possible (Tableau 5).

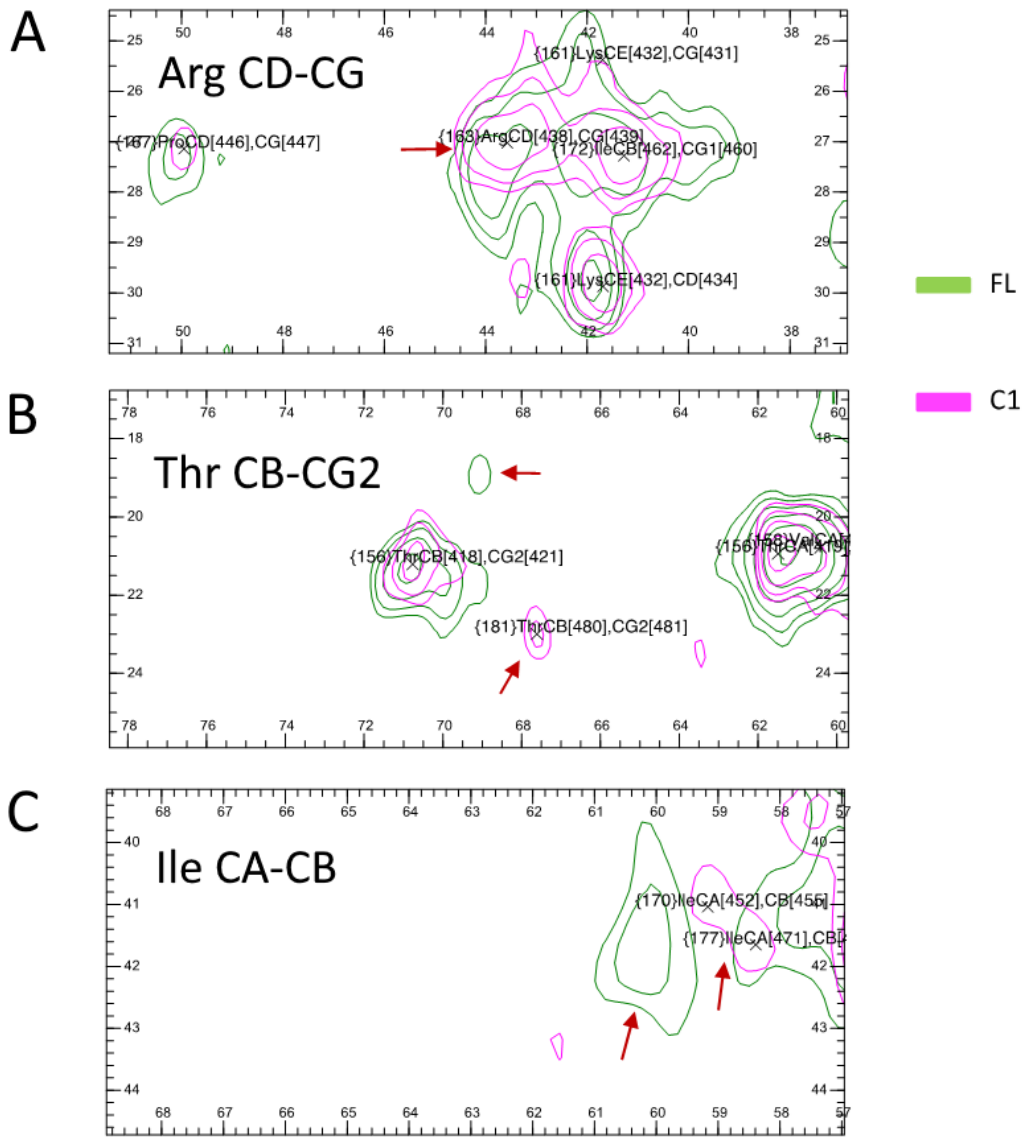

Figure 29 : Zooms sur spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrP rec Δ190-196 pleine longueur (vert) et C1 (rose). A : Corrélation CD-CG des résidus Arg. B : Corrélation CB-CG2 des résidus Thr. C : Corrélation CA-CB des résidus Ile.

En superposant les deux spectres 2D ^{13}C-^{13}C dipolaires des fibres de pleine longueur et tronquées (**Figure 28**) nous constatons que la réduction de la séquence a eu pour conséquence la disparition d'un certain nombre de signaux. Cependant les pics présents possèdent des déplacements chimiques très proches de ceux des fibres pleines longueurs, ce qui suggère des structures relativement proches. Des différences en termes de déplacement chimique sont observables pour les résidus arginine et isoleucine qui ne sont pourtant pas présents dans la région délétée (**Figure 29 A et C**). Finalement le deuxième système de spin de la thréonine qui

présente un CB à 69,2 ppm et un CG2 à 19,2 ppm est remplacé par un système de spin thréonine présentant un CB a 67,6 ppm et un CG2 à 23,0 ppm (**Figure 29 B**).

En conclusion la réduction de la séquence PrP à sa partie C-terminale C1 a conduit à des fibres présentant une structure légèrement différente de celle des fibres pleine longueur mais qui semblent posséder une hétérogénéité structurale équivalente, voire supérieure.

La présence d'un signal flexible a été détecté grâce sur un spectre 1D INEPT (**Figure 30**). Ce résultat est en accord avec l'étude AFM de ces fibres (non montré) qui met en évidence la présence d'une courte partie flexible en périphérie du corps rigide.

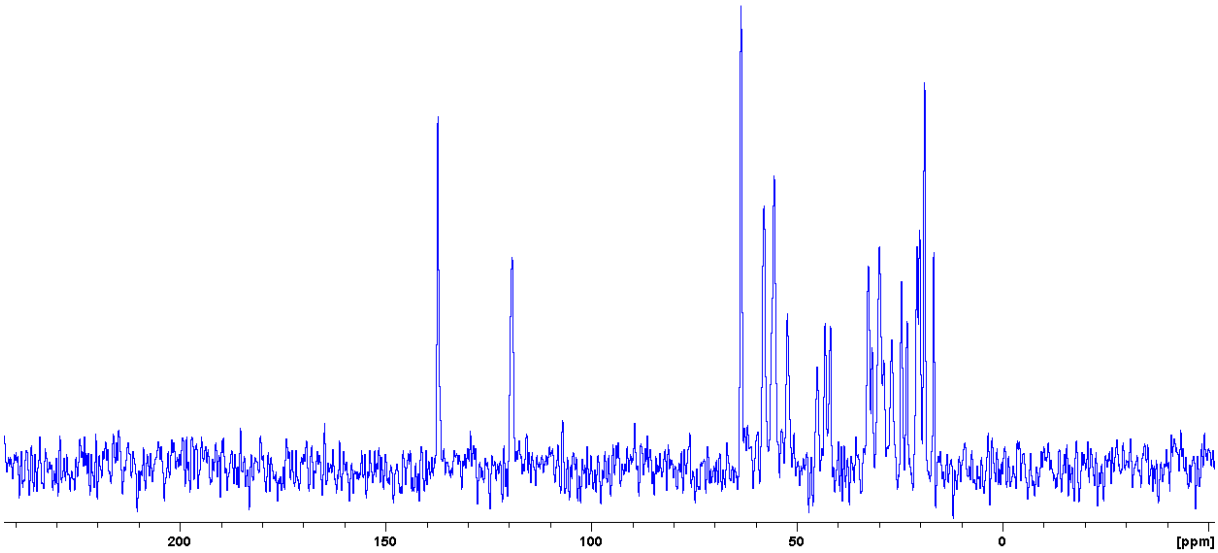

Figure 30 : Spectre 1D 13C « Refocused INEPT » de fibres de PrPrec Δ190-196 C1 mettant en évidence la présence de régions flexibles et mobiles.

2.5. Analyse des régions rigides de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après maturation

2.5.1. Spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaires de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après « annealing » (avant traitement PK)

Nous avons incubé des fibres de PrP recombinantes pleine longueur Δ190-196 marquées aux isotope C ^{13} et N^{15} dans le tampon 1% triton x-100, 50 mM Tris, 300 mM Nacl pH 7,4 à 37°C pendant une heure. Nous avons alors observé la formation de paquets d'aspects filamenteux visible a l'œil nu. Nous avons récupéré les fibres par ultracentrifugation, les avons lavées avec un tampon 10 mM acétate de sodium pH 5 (3 fois) afin d'éliminer un maximum de triton avant l'analyse RMN. Nous avons vérifié que les fibres restaient positives à la ThT après ce traitement.

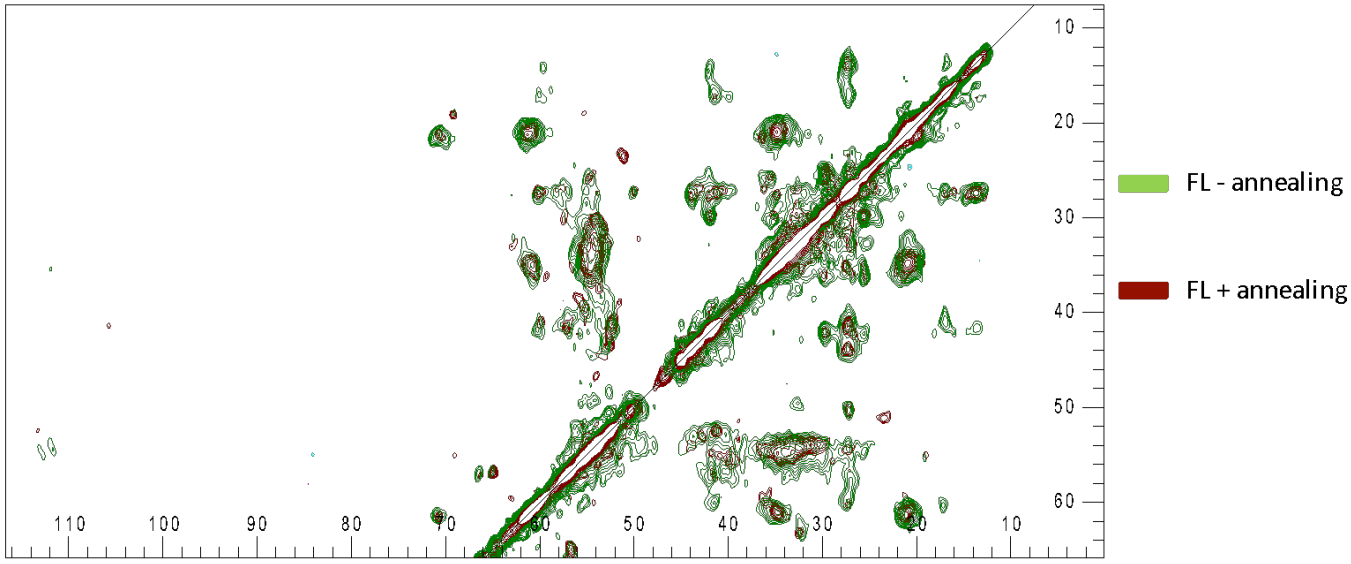

Figure 31 : Superposition des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 de pleine longueur maturées (brun) et non maturées (vert, Figure 13). Le spectre des fibres maturées a été acquis avec une séquence PARIS et avec des fréquences de Larmor 201.2 MHz (^{13}C) et 800.3 MHz (^{1}H). Vitesse de rotation à l'angle magique 13 kHz.

Un échantillon a été préparé avec 1,4 mg de fibres à une concentration de 1,6 mM afin d'observer l'effet du traitement sur la partie rigide des fibres. Il a été placé dans un rotor de 3.2 mm de diamètre. Un spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage dipolaire a été acquis avec un temps de mélange de 25 ms afin d'observer la partie rigide des fibres. La séquence DARR a été remplacée par la séquence PARIS (Weingarth *et al*., 2010). Toutes les mesures ont été effectuées avec rotation à l'angle magique avec une vitesse de 13 kHz, à une température de 293 K. Les spectres RMN ont été acquis à une fréquence de 201.2 MHz pour le carbone 13 (^{13}C) et 800.3 MHz pour le proton (^{1}H). Un exemple de spectre de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire est donné dans la **Figure 31**.

Comme pour les autres échantillons précédents, une certaine ambiguïté persiste pour l'attribution des signaux RMN. Le résultat de l'attribution est résumé dans le Tableau 6. L'ambiguïté due à la superposition de signaux n'est pas très importante : on la retrouve dans la zone autour de 54 ppm pour les corrélations liées aux CA des résidus Arg, Lys et Trp et pour la corrélation CA-CG2 des résidus Thr et Val.

Comme pour les autres spectres, la totalité ou une partie plus ou moins importante des pics d'un système de spin sont indétectables car trop faibles en intensité. Cette perte de signal concerne les carbones des chaînes latérales des résidu Arg, Lys, Ile, Tyr et Trp, une partie du système de spin Pro et la totalité des systèmes de spin Leu, Met, Phe et His (Tableau 6).

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	x	CA-CG2	x
Ser	Oui	x	x	x
Arg	Oui	Partielle chaine laterale	CA-CB	x
Lys	Oui	Chaine laterale	Partielle CA	x
Val	Oui	x	CA-CG2	x
Ala	Oui	x	x	x
Pro	Oui	Partielle	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Trp	possible	Chaine laterale	possible CA-CB	possible
Gln	Oui	x	Possible	x
Asn	Oui	x	x	x
Asp	Oui	x	x	x
Glu	Oui	x	x	x
Ile	Oui	Carbones CG2 et CD1	x	x
Cys	Possible	Oui	x	Possible
His	x	x	x	Oui
Phe	x	x	x	Oui
Tyr	Oui	Oui	x	x
Met	x	x	x	Oui
Leu	x	x	x	Oui

Tableau 6 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées.

La comparaison des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire des fibres recombinantes pleine longueur Δ190-196 maturées et non maturées montre une superposition de la majorité des pics (**Figure 31**).

Cependant certaines différences entre les deux spectres existent. Ainsi nous observons après incubation : des pics moins étendus pour les résidus valines et thréonines (**Figure 32 A et B**), un gain d'intensité pour la corrélation CA-CB des alanines (**Figure 32 C**) et une perte d'intensité pour les signaux correspondant aux CG2 et CD1 des résidus isoleucines (**Figure 32 D**).

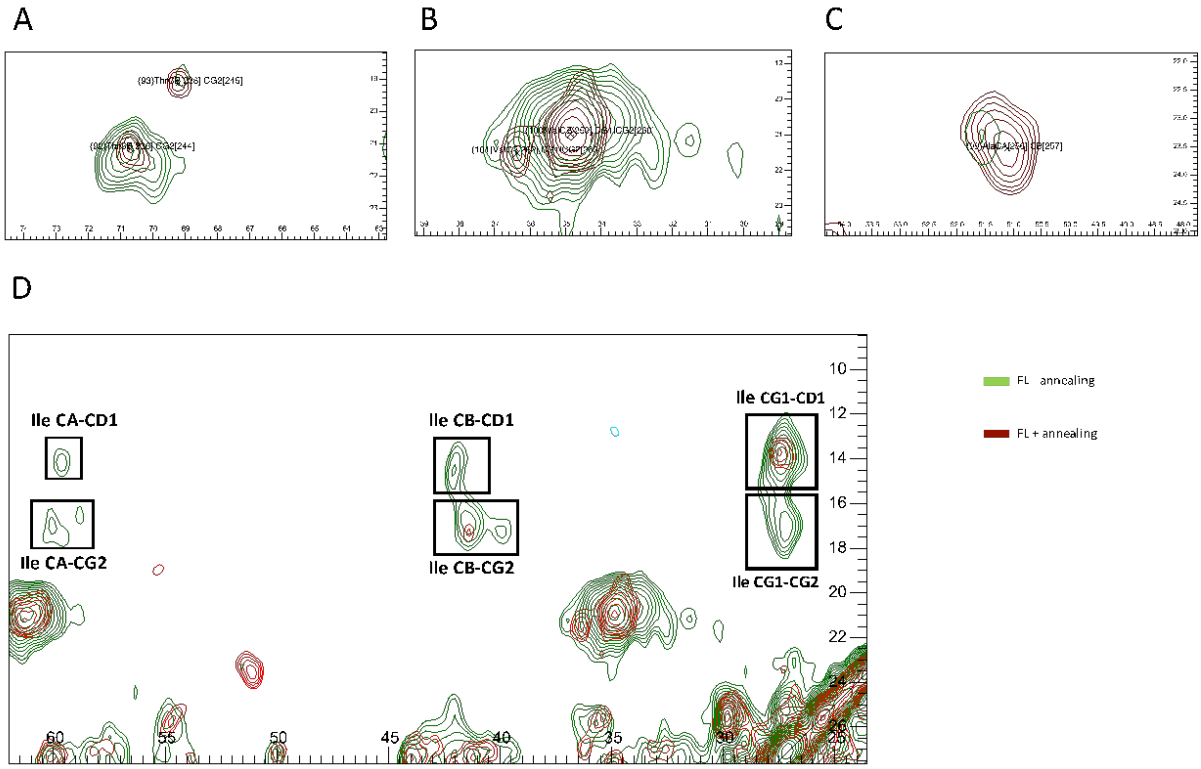

Figure 32 : Zooms sur le spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 pleine longueur maturées (brun) et non maturées (vert). A : Corrélation CB-CG2 des résidus Thr. B : Corrélation CB-CG1/CG2 des résidus Val. C : Corrélation CA-CB des résidus Ala. D : Corrélation liées aux carbones CG2 CD1 des résidus Ile.

2.5.2. Spectres de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaires de fibres amyloïdes de PrP Δ190-196 après « annealing » et traitement PK

Nous avons traité à la PK 6 mg de fibres de PrP recombinante pleine longueur Δ190-196 marquées aux isotope ^{13}C et ^{15}N dans le tampon 1% triton x-100 50mM Tris, 300mM NaCl pH 7,4 à 37°C pendant une heure afin d'éliminer toutes les structures sensibles à la PK. Le rapport PrP/PK pendant la digestion était de (1/25). D'après les tests effectués précédemment nous nous attendons à une élimination de 80%-90% de la protéine ce qui amènerait la quantité de PrP après traitement à 0,6 mg à 1,2 mg. Cependant les tests précédents avaient lieu avec de petits volumes d'échantillon (20-30 µl). Pour la préparation finale nous avons effectué l'expérience avec un volume de 130 ml, ce qui entraîne une certaine incertitude dans notre estimation.

Nous avons effectué une analyse par RMN du solide de ces fibres dans un tampon 10 mM acétate de sodium pH 5 placé dans un rotor de 3.2 mm de diamètre. Un spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplage dipolaire a été acquis avec un temps de mélange de 25 ms, avec la séquence PARIS. Les mesures ont été effectuées avec rotation à l'angle magique avec une vitesse de 13 kHz, à une température de 293 K. Les spectres RMN ont été acquis à une fréquence de 201.2 MHz pour le carbone 13 (^{13}C) et 800.3 MHz pour le proton (^{1}H). Un exemple de spectre de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire est donné dans la **Figure 33**.

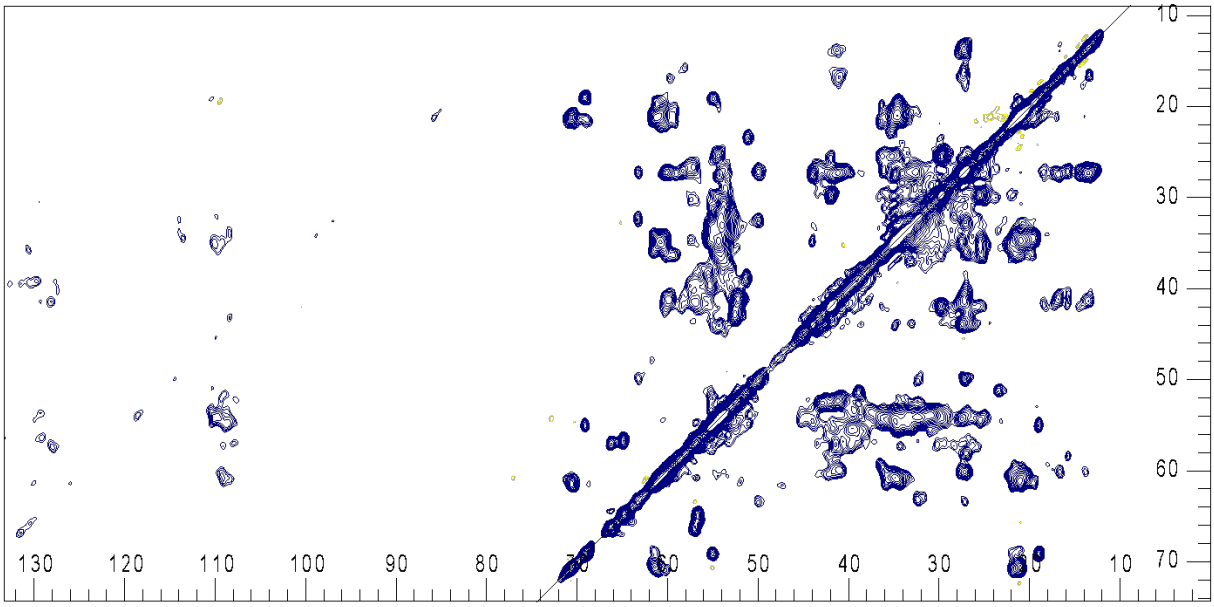

Figure 33 : Spectre 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C dipolaire avec un temps de mélange de 25 ms de fibres de PrPrec Δ190-196 PK^{res} (maturées et traitées PK). Le spectre a été acquis avec une séquence PARIS et avec des fréquences de Larmor 201.2 MHz (^{13}C) et 800.3 MHz (^{1}H). Vitesse de rotation à l'angle magique 13 kHz.

Ici aussi, une certaine ambiguïté d'attribution persiste. Cependant le rapport signal/bruit étant nettement plus élevé que pour les autres échantillons et certains pics plus fins, l'ambiguïté d'attribution s'en trouve réduite.

Beaucoup de signaux ont pu être attribués à des acides aminés en particulier (Tableau 7). L'ambiguïté due à la superposition de signaux concernent la corrélation CA-CG2 des résidus Thr et Val, la zone autour de 54 ppm notamment pour la corrélation CA-CB des résidus Trp et Arg et les corrélations liées au CA des Lys. Comme pour les autres échantillons, la totalité ou une partie plus ou moins importante des pics d'un système de spin sont indétectables car trop faibles. La perte d'une partie du système de spin concerne la chaîne latérale des résidus Tyr, Lys et Trp ainsi que les corrélations CZ-CA et CZ-CG1 des Arg. Aucun signal n'est détecté pour les systèmes de spin des résidus Met, Leu, His et Phe.

Nous avons parfois observé différents systèmes de spin correspondant à un même type de résidu, notamment 3 systèmes différents pour les résidus Thr et Ser et 2 systèmes pour les résidus Arg et Asp. Les pics correspondant aux valines sont toujours particulièrement étendus mais semblent se distinguer en 2 ou 3 systèmes différents.

Résidu	Présent	Ambiguïté signal faible	Ambiguïté supperposition	Absent
Thr	Oui	x	CA-CG2	x
Ser	Oui	x	x	x
Arg	Oui	CZ-CA, CZ-CG1	CA-CB	x
Lys	Oui	Chaine laterale	Partielle CA	x
Val	Oui	x	CA-CG2	x
Ala	Oui	x	x	x
Pro	Oui	x	x	x
Gly	Oui	x	x	x
Trp	Oui	Chaine laterale	CA-CB	x
Gln	Oui	x	Possible	x
Asn	Oui	x	x	x
Asp	Oui	x	x	x
Glu	Oui	x	x	x
Ile	Oui	x	x	x
Cys	Oui	x	x	x
His	x	x	x	Oui
Phe	x	x	x	Oui
Tyr	Oui	Chaine laterale	x	x
Met	x	x	x	Oui
Leu	x	x	x	Oui

Tableau 7 : Systèmes de spins trouvés pour les spectres de corrélation ^{13}C-13C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées et traitées PK

La **Figure 34** montre la comparaison entre les spectres de corrélation 13C-13C dipolaire entre fibres de PrPrec Δ190-196 non traitées et celles qui ont été maturées, puis traitées PK. Celui des fibres maturées traitées à la PK présente des pics plus fins et plus intenses que celui obtenu avec des fibres non traitées. Nous observons aussi l'apparition d'un nombre important de signaux supplémentaires, notamment un signal correspondant à Asn et des signaux dans la région carbone aromatiques (105-135 ppm, **Figure 33**). Ceci suggère que la maturation associée au traitement PK a permis une amélioration du signal.

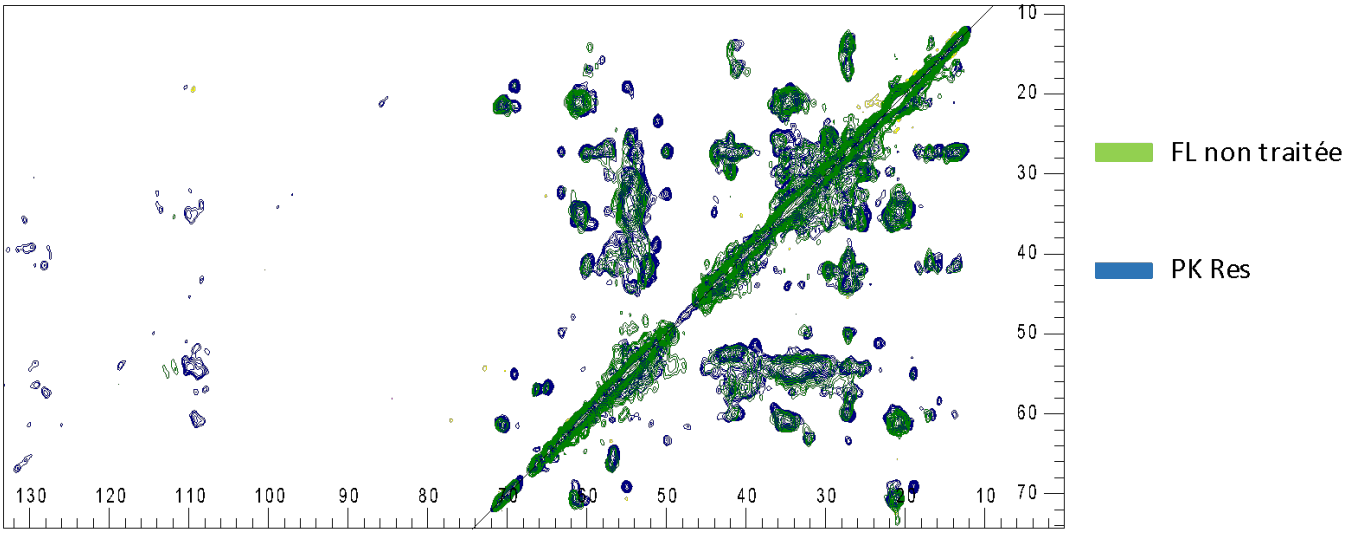

Figure 34 : Superposition de spectres 2D de corrélation 13C-13C dipolaire de fibres de PrPrec Δ190-196 non traitées (vert) et celles qui ont été maturées et traitées PK (bleu).

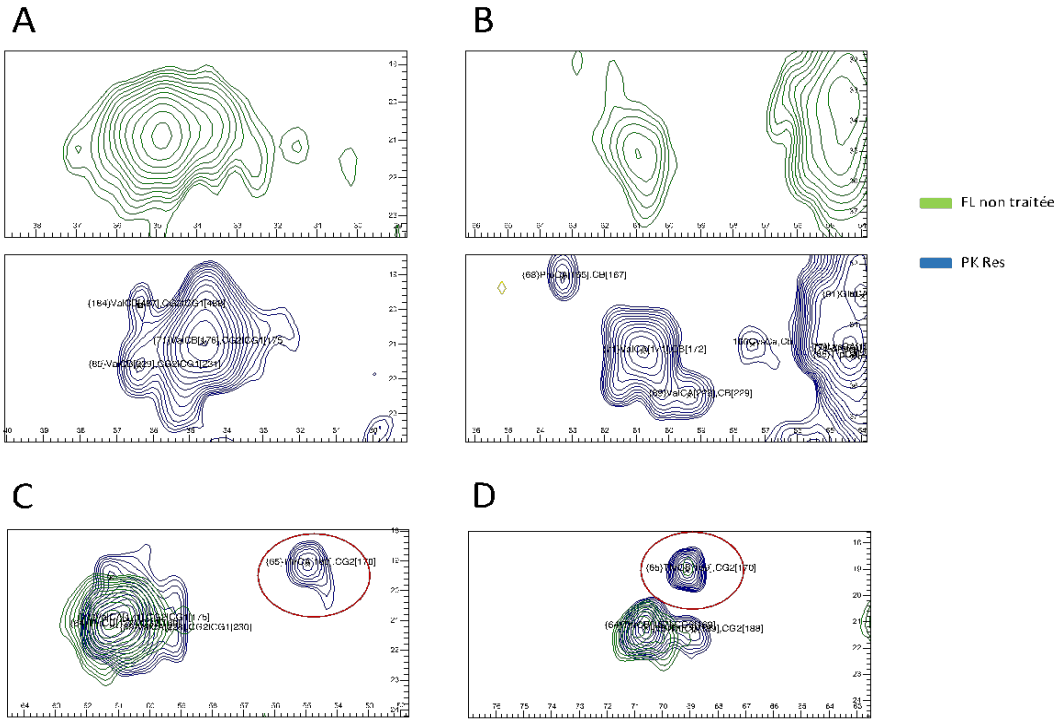

Figure 35 : Zooms sur le spectre DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 pleine longueur non maturées (vert) et maturées traitées PK (bleu). A : Corrélation CB-CG2 des résidus Val. B : Corrélation CA-CB des résidus Val. C : Corrélation CB-CG2 des résidus Thr. D : Corrélation CB-CG2 des résidus Thr.

De façon globalement nous observons une superposition de la grande majorité des pics, suggérant que la structure observée après traitement PK préexiste dans les fibres non traitées. Nous observons cependant une modification de l'aspect des pics correspondant aux résidus Val (**Figure 35 A et B**) et quelques légères différences pour les résidus Thr, avec une augmentation considérable du signal du système de spin avec des déplacements chimiques CA de 54,9 ppm et CB de 6,09 ppm (**Figure 35 C et D**).

La comparaison des spectre DARR des fibres maturées avant et après traitement PK montre des résultats similaires, à savoir une superposition des pics et une amélioration globale du rapport signal sur bruit, suggérant une possible sélection d'une population de structure (**Figure 36)**.

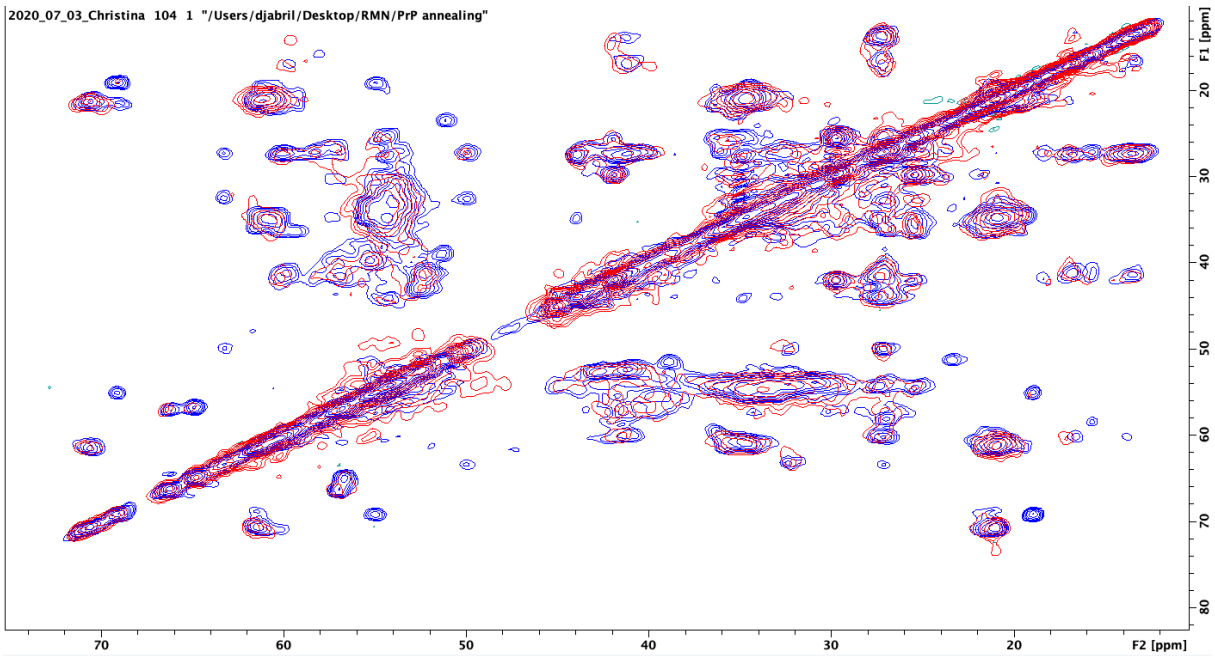

Figure 36 : Superposition de spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C DARR de fibres de PrPrec Δ190-196 maturées avant (rouge) et après (bleu) traitement PK

2.6. Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB de tous les résidus identifiés dans les différents spectres attribués.

Il existe une corrélation empirique entre la conformation du squelette peptidique d'une protéine et les déplacements chimiques des atomes HA, CA, CB et CO de chaque résidu. Il est donc

possible à partir des déplacements chimiques d'un résidu de déduire la structure secondaire dans laquelle il se trouve. Pour se faire il faut soustraire au déplacement chimique observé expérimentalement un déplacement chimique de référence correspondant à une structure flexible, la structure secondaire est ensuite prédite en fonction de la valeur obtenue.

Pour un CA supérieur à la valeur de référence d'au moins 2,6 et un CB inférieure à la valeur de référence d'au moins 0,4 on prédit une hélice. Pour un CA inférieur à la valeur de référence d'au moins 1,4 et un CB supérieure à la valeur de référence d'au moins 2,2 on prédit une Feuillet beta. Pour toutes les valeurs intermédiaires on considère que le résidu se trouve dans une région flexible (boucle, coude). Nous avons effectué cette opération sur les déplacements chimique de tous les carbones CA et CB de tous les résidus des spectres décrit ci-dessus afin de former les tableau 8 à 13.

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	
Ala	51,44	53,15	23,25	18,99	-1,71	4,26	Beta
Arg	54,45	56,79	35,03	30,68	-2,34	4,35	Beta
Asp	55,05	54,66	39,7	40,86	0,39	-1,16	Flexible
Asn	52,91	53,54	43,1	38,67	-0,63	4,43	Flexible
Glu	54,41	57,34	33,42	30	-2,93	3,42	Beta
Ile	60,1	61,61	41,71	38,61	-1,51	3,1	Beta
Lys	54,78	56,97	35,76	32,77	-2,19	2,99	Beta
Pro	62,75	63,32	31,99	31,84	-0,57	0,15	Flexible
Ser	56,89	58,72	66,38	63,79	-1,83	2,59	Beta
Thr	61,33	62,2	70,82	69,7	-0,87	1,12	Flexible
Tyr	54,77	58,1	41,96	39,3	-3,33	2,66	Beta
Val	60,8	62,45	34,96	32,72	-1,65	2,24	Beta

Tableau 8 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre DARR des fibres Δ190-196 de pleine longueur avec un temps de mélange de 25 ms

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	
Ala	52,12	53,15	19,05	18,99	-1,03	0,06	Flexible
Ala	52,3	53,15	21,16	18,99	-0,85	2,17	Beta ?
Ala	55,62	53,15	19,05	18,99	2,47	0,06	Flexible ?
Arg	54,67	56,79	35,03	30,68	-2,12	4,35	Beta
Asp	55,01	54,66	41,75	40,86	0,35	0,89	Flexible
Asn	52,6	53,54	41,33	38,67	-0,94	2,66	Beta ?
Cys	56,23	58,11	34,38	32,93	-1,88	1,45	Beta ?
Glu	56,67	57,34	29,29	30	-0,67	-0,71	Flexible
Glu	54,45	57,34	33,73	30	-2,89	3,73	Beta
His	58,37	56,49	27,15	30,19	1,88	-3,04	Beta
Ile	59,75	61,61	41,79	38,61	-1,86	3,18	Beta
Leu	54,89	55,65	41,42	42,29	-0,76	-0,87	Flexible
Lys	54,87	56,97	35,41	32,77	-2,1	2,64	Beta
Met	x	56,13	35,06	33,01	#VALEUR!	2,05	Beta ?
Pro	62,79	63,32	32,01	31,84	-0,53	0,17	Flexible
Ser	57,78	58,72	63,6	63,79	-0,94	-0,19	Flexible
Ser	54,6	58,72	60,08	63,79	-4,12	-3,71	Flexible
Thr	61,53	62,2	70,62	69,7	-0,67	0,92	Flexible
Tyr	56,94	58,1	41,5	39,3	-1,16	2,2	Beta
Val	61,08	62,45	34,86	32,72	-1,37	2,14	Beta

Tableau 9 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre DARR des fibres Δ190-196 de pleine longueur avec un temps de mélange de 200 ms

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	SS
Ala	52,16	53,15	18,92	18,99	-0,99	-0,07	Flexible
Arg	55,7	56,79	30,51	30,68	-1,09	-0,17	Flexible
Asn	52,77	53,54	38,47	38,67	-0,77	-0,2	Flexible
Gln	55,8	56,58	29,15	29,17	-0,78	-0,02	Flexible
Lys	56,02	56,97	32,7	32,77	-0,95	-0,07	Flexible
Pro	62,96	63,32	31,53	31,84	-0,36	-0,31	Flexible
Ser	58,14	58,72	63,5	63,79	-0,58	-0,29	Flexible
Thr	61,81	62,2	69,63	69,7	-0,39	-0,07	Flexible
Trp	57	57,67	29,21	29,98	-0,67	-0,77	Flexible
Tyr	55	58,1	37,96	39,3	-3,1	-1,34	???
Val	63	62,45	32,48	32,72	0,55	-0,24	Flexible

Tableau 10 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre TOBSY des fibres Δ190-196 de pleine longueur.

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	
Arg	54,3	56,79	32,38	30,68	-2,49	1,7	Beta ?
Asp	52,94	54,66	42,96	40,86	-1,72	2,1	Beta
Asp	52,1	54,66	41,32	40,86	-2,56	0,46	Flexible
Glu	57,56	57,34	30,26	30	0,22	0,26	Flexible
Gln	53,94	56,58	33,02	29,17	-2,64	3,85	Beta
Ile	59,17	61,61	41,06	38,61	-2,44	2,45	Beta
Lys	54,48	56,97	34,61	32,77	-2,49	1,84	Beta ?
Pro	62,83	63,32	32,97	31,84	-0,49	1,13	Flexible
Thr	61,53	62,2	70,57	69,7	-0,67	0,87	Flexible
Thr	61,53	62,7	70,57	67,45	-1,17	3,12	Beta
Tyr	56,57	58,1	41,7	39,3	-1,53	2,4	Beta
Val	60,5	62,45	34,74	32,72	-1,95	2,02	Beta ?

Tableau 11 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres C1 Δ190-196 avec un temps de mélange de 25 ms.

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	
Ala	51,08	53,15	23,58	18,99	-2,07	4,59	Beta
Arg	53,8	56,79	34,87	30,68	-2,99	4,19	Beta
Asp	52,52	54,66	43,16	40,86	-2,14	2,3	Beta
Asp	52,38	54,66	41,17	40,86	-2,28	0,31	flexible ?
Asn	51,63	53,54	39	38,67	-1,91	0,33	flexible
Glu	57,46	57,34	30,24	30	0,12	0,24	flexible
Gln	54,03	56,58	32,57	29,17	-2,55	3,4	Beta
Ile	59,83	61,61	40,86	38,61	-1,78	2,25	Beta
Lys	54,68	56,97	35,3	32,77	-2,29	2,53	Beta
Pro	62,63	63,32	32,54	31,84	-0,69	0,7	flexible
Ser	57,2	58,72	66,26	63,79	-1,52	2,47	Beta
Ser	56,78	58,72	65	63,79	-1,94	1,21	flexible ?
Thr	61,73	62,2	70,84	69,7	-0,47	1,14	flexible
Thr	55,05	62,2	68,99	69,7	-7,15	-0,71	flexible ?
Tyr	57,22	58,1	41,53	39,3	-0,88	2,23	Beta ?
Val	59,27	62,45	36,11	32,72	-3,18	3,39	Beta
Val	60,76	62,45	35	32,72	-1,69	2,28	Beta

Tableau 12 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres Δ190-196 de pleine longueur maturées avec un temps de mélange de 25 ms.

Résidu	CA ob	CA Ref	CB ob	CB Ref	CA ob-Ref	CB ob-Ref	
Ala	51,13	53,15	23,47	18,99	-2,02	4,48	Beta
Arg	54,22	56,79	32,59	30,68	-2,57	1,91	Beta ?
Asp	52,53	54,66	42,87	40,86	-2,13	2,01	Beta ?
Asp	52,21	54,66	41,07	40,86	-2,45	0,21	flexible
Asn	51,36	53,54	38,9	38,67	-2,18	0,23	flexible
Cys	57,38	58,11	34,67	32,93	-0,73	1,74	flexible
Glu	57,38	57,34	30,21	30	0,04	0,21	flexible
Gln	53,95	56,58	33,06	29,17	-2,63	3,89	Beta
Ile	59,8	61,61	41,22	38,61	-1,81	2,61	Beta
Ile	58,26	61,61	41,75	38,61	-3,35	3,14	Beta
Lys	54,41	56,97	35,21	32,77	-2,56	2,44	Beta
Pro	63,3	63,32	32,45	31,84	-0,02	0,61	flexible
Ser	57	58,72	66,18	63,79	-1,72	2,39	Beta
Ser	54,45	58,72	60,51	63,79	-4,27	-3,28	???
Thr	61,44	62,2	70,6	69,7	-0,76	0,9	flexible
Thr	55,06	62,2	69,11	69,7	-7,14	-0,59	flexible
Trp	54,25	57,67	35,03	29,98	-3,42	5,05	Beta
Tyr	56,96	58,1	41,47	39,3	-1,14	2,17	Beta ?
Val	60,78	62,45	34,86	32,72	-1,67	2,14	Beta ?
Val	59,37	62,45	36,29	32,72	-3,08	3,57	Beta

Tableau 13 : Prédiction des structures secondaires à partir des déplacements chimiques des carbones CA et CB observés dans le spectre PARIS des fibres Δ190-196 de pleine longueur maturées et traitées PK avec un temps de mélange de 25 ms.

D'après les résultats obtenus nous observons sur tous les spectres DARR l'absence d'hélice alpha et la présence de feuillets bêta et de structures plus flexibles correspondant à de courtes boucles ou à des coudes. Ceci suggère que la partie rigide de toutes les fibres analysées est composée exclusivement de feuillets bêta reliés entre eux par de courtes parties flexibles. La prédiction des structures secondaires donne des résultats quasi similaires pour tous les échantillons suggérant des structures proches voir identique, une des rare différence concerne la présence de résidus Thr et Asp dans des feuillets bêta pour les fibres C1 Δ190-196 qui suggère encore une fois que la structure de ces fibres est légèrement différente de celle des fibres de pleine longueur. Le spectre TOBSY qui permet d'observer la partie intrinsèquement désordonnée des fibres présente sans surprise des déplacements chimiques suggérant un squelette peptidique flexible

3. Matériel et méthodes

3.1. Expression et purification de la PrP recombinante

Les PrP Wt et mutante ont été produites et purifiées à partir d'Escherichia coli BL21 (DE3) selon un protocole décrit dans la référence (Munoz-Montesino et al., 2020). Les bactéries ont été incubées dans du milieu LB et l'expression de la protéine a été induite par l'ajout de d'isopropyl thio-ß-D-galactoside (IPTG) a une concentration finale d'1 µM. Après une incubation d'une nuit, les bactéries sont centrifugées puis remises en suspension dans un tampon Tris-EDTA a 37°C contenant du triton. Elles sont par la suite soniquées sur de la glace et centrifugées de nouveau afin de récupérer les corps d'inclusions contenant la protéine d'intérêt. Les culots sont remis en suspension sous agitation pendant 24h a 4°C dans une solution contenant 6M de chlorure de guanidinium (GdHCl) et 2,5 mM d'imidazole. La suspension récupérée est clarifiée par centrifugation. La PrP recombinante est ensuite isolée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel, elle est renaturée sur la colonne avec un tampon 20mM Tris, 100mM NaCL pH 7,4 puis éluée avec un tampon contenant de l'imidazole (2,5 mM). Ensuite un dessalage est réalisé sur une colonne G25, la PrP recombinante est alors récupérée dans un tampon acétate d'ammonium (0,5g/L, pH 4,6). La concentration finale en protéine est estimée par la mesure de l'absorbance a 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction de 59485 M^{-1} cm^{-1} pour la protéine de pleine longueur (23-234), 18005 M^{-1} cm^{-1} pour la PrP tronquée en N-terminal (103-234) et pour le fragment C1 de la PrP (113-234). Un gel SDS-PAGE avec une coloration au bleu de coomassie a permis d'estimer la pureté de la protéine. La protéine est ensuite lyophilisée et conservée a -80°C.

Pour les expériences RMN une protéine marquée aux isotope lourd a été produite en suivant la même procédure mais en remplaçant le milieu LB par un milieu de culture minimum M9 contenant du 15NH4Cl comme source d'azote 15 et du glucose-13C comme source de carbone 13.

3.2. Formation des fibres amyloïdes de PrP recombinante

Des fibres amyloïdes ont été formées selon les procédures décrites précédemment (Torrent et al., 2019 ; Breydo et al., 2008). Pour former les fibres, des solutions mères de PrP recombinante ont été préparées en remettant en suspension dans un tampon 50mM MES, 2M GdHCl pH 6 de

la PrP lyophilisée de façon à obtenir une concentration finale de protéine de 22 µM. Les réactions de fibrillation ont été réalisées dans des tubes en polypropylène coniques de 15ml avec un volume réactionnel total de 8ml. Pendant la fibrillation les tubes sont disposés horizontalement sur une surface plane, sous agitation orbitale continue avec une amplitude de 16 mm, a une vitesse de 30 rotations/minute et a une température de 30°C. La formation des fibres est suivie en détectant la fluorescence de la thioflavine T (ThT) (Breydo et al., 2008). Pour se faire des aliquots ont été prélevés et dilués à une concentration finale de PrP de 0,3 µM dans un tampon acétate de sodium 10mM pH 5 contenant de la ThT à une concentration finale de 10 µM. Les spectres d'émissions de la fluorescence ont été enregistrés après une excitation a 450 nm. Pour arrêter la réaction la solution est placée a 4°C, puis dialysée avec de l'acétate de sodium 10 mM pH 5. Les fibres sont ensuite récupérées par ultracentrifugation à 60.000 rpm pendant 45 minutes dans une ultracentrifugeuse Beckman Optima TL100 et un rotor TLA-100.3. Le culot est remis en suspension dans une solution de 10 mM d'acétate de sodium, pH 5,0.

3.3. Fibrillation de PrP recombinante en présence d'amorce.

La cinétique de formation de fibres amyloïdes de PrP en présence d'amorce a été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaques (SAFAS Xenius XML) couplé au test de fluorescence standard à base de ThT (concentration finale de ThT de 10 µM). Au milieu réactionnel identique à celui utilisé pour la fibrillation en tubes nous avons ajouté des fibres amyloïdes de PrP a une concentration finale de 0,2 et 0,1 µM afin qu'elles servent d'amorce. Ce milieu réactionnel a ensuite été déposé dans des microplaques noires de 96 puits pour un volume de 100ul par puits. Les expériences de cinétique ont été réalisées à 33 ° C sous une agitation continue à 240 tr / min. Afin d'évaluer la reproductibilité de la cinétique, 10 puits de microplaque ont été remplis avec chaque échantillon. L'émission de la fluorescence de la ThT a été enregistrée à une longueur d'onde de 492 nm après une excitation a 450 nm avec un intervalle de mesure de 30 minutes.

3.4. Maturation des fibres amyloïdes de PrP recombinante

Pour les expériences de maturation, des fibres de PrP ont été incubées à 37°C ou 70°C à une concentration finale de 10 µM dans un tampon 50 mM Tris-HCl, NaCl 300mM, pH 7,4 et 1% Triton X-100 pendant une heure. Ensuite, les fibres ont été traitées à la PK avec un rapport

PK:PrP de 1:100 ou 1:50 pendant une heure à 37 ° C. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 95 ° C pendant 10 minutes et analysés sur des gels SDS-PAGE à 12% (gel préfabriqué Criterion XT, BioRad).

Pour la préparation destinée à l'étude par RMN du solide des fibres marquée C^{13} N^{15} ont été utilisées. La maturation a eu lieu dans le même tampon que précédemment mais avec une concentration finale de fibres de 2 µM et un rapport PK : PrP de 1 : 25, à la fin de la réaction nous avons ajouté un inhibiteur des protéases Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich) à une concentration finale de 4 mM. Les fibres ont été récupérées par ultracentrifugation a 55.000 rpm pendant 45 minutes dans une ultracentrifugeuse Beckman Optima LE-80K avec un rotor Type 70 Ti suivie d'une deuxième ultracentrifugation a 60.000 rpm de 45 minutes dans une ultracentrifugeuse Beckman Optima TL100 avec un rotor TLA-100.3.

3.5. RMN du solide

Des expériences de RMN avec rotation à l'angle magique (magic angle spinning, MAS) ont été faites sur deux spectromètres Bruker, équipés de consoles Avance III, d'unités pneumatiques MAS II et d'unités de régulation de la température :

- spectromètre 700 MHz (Gif-sur-Yvette) équipé d'une sonde CPMAS 4 mm : fréquence ^{13}C 175.8 MHz, fréquence ^{1}H 699.3 MHz, vitesse de rotation 11 kHz, température 293 K,
- spectromètre 800 MHz (ENS, Paris, via l'infrastructure IR-RMN du CNRS) équipé d'une sonde CPMAS 3.2 mm e-free: fréquence ^{13}C 201.2 MHz, fréquence ^{1}H 800.3 MHz, vitesse de rotation 13 kHz ou 10.2 kHz, température 288 K.

Des spectres 1D ^{13}C ont été acquis, soit en acquisition directe (séquence hpdec), soit avec une séquence de type refocused INEPT (Massiot, *et al.*, 2003), soit par polarisation croisée (séquence CPramp). Les fenêtres spectrales ^{13}C étaient de 250 ou 300 ppm et le milieu de fenêtre de 90 ppm. Pour les acquisitions avec polarisation croisée (CP), le nombre de points en acquisition directe était de 1024, pour les acquisitions sans CP le nombre de points était de 4096. Les délais de recyclage étaient de 3 s. Les longueurs des impulsions étaient : 3.0 µs pour ^{1}H et 4.6 µs pour ^{13}C à 700 MHz et 3.0 µs pour ^{1}H et 4.5 µs pour ^{13}C à 800 MHz. Les schémas de découplage ^{1}H était SPINAL64, avec une puissance de 67 kHz à 700 MHz et de 72 kHz à 800 MHz. Les blocs de CP ^{1}H-^{13}C avaient un profil de rampe linéaire de 80 à 100 % à 700 MHz et de 50 à 100 % à 800 MHz en ^{1}H, des durées de 600 µs à 700 MHz et 320 µs à 800 MHz, et des puissances de 32 et 49 kHz pour ^{1}H et ^{13}C, respectivement, à 700 MHz et 37 et 43 kHz pour

^{1}H et ^{13}C, respectivement, à 800 MHz. Le nombre de scans était de 128 ou 256. Les spectres ont été traités avec une apodisation gaussienne-lorentzienne avec une largeur de 25 Hz. Les déplacements chimiques ^{13}C ont été référencés avec de l'adamantane à 40.49 et 31.28 ppm pour les carbones CH et CH_2 (Harris et al., 2008).

Des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplages dipolaires ont été acquis avec une séquence de type Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR) (Takegoshi et al., 2001) à 700 MHz et une séquence de type Phase-Alternated Recoupling Irradiation Scheme (PARIS) (Weingarth *et al*., 2010) à 800 MHz. Ces spectres ont été acquis avec différents temps de mélange de 25, 50, 100, 200 et/ou 250 ms. Les largeurs spectrales étaient de 300x300 ou 300x220 ppm avec un nombre de points de 1024x256 ou 1024x400. Le nombre de transitoires pour chaque sous-spectre 1D allait de 64 à 128.

Des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplages scalaires ont été acquis soit avec une séquence de type TOtal through Bond correlation SpectroscopY (TOBSY, séquence tobsy_2dcc) (Andronesi *et al*., 2008) avec des temps de mélange de 6.17 et/ou 15 ms, soit avec une séquence de type refocused INEPT 2D avec des temps de mélange de 0, 4 et/ou 15 ms. Pour les spectres TOBSY la vitesse de rotation à l'angle magique a été réduite à 10.2 kHz à 800 MHz.

4. Discussion

Dans le cadre de cette thèse nous avons fait une étude structurale par RMN du solide des fibres de PrP Δ190-196 de pleine longueur et de la PrP mutante tronquée (113-234, taille du fragment C1). Ces fibres ont démontré une infectivité sur des cellules exprimant une PrP portant la même délétion ce qui rend leur caractérisation structurale d'autant plus pertinente. D'après la littérature et les résultats obtenues par AFM les fibres recombinantes de PrP s'organisent en deux parties, une région N-terminale intrinsèquement désordonnée présente à la périphérie des fibres et une région C-terminale structurée constituant le cœur de la fibre (Muller et al., 2014 ; Tycko et al., 2010). Dans le but d'observer à la fois les parties rigides et les parties flexibles des fibres sur un même échantillon nous avons acquis des spectres 2D de corrélation ^{13}C-^{13}C par couplages dipolaires de type DARR (parties rigides) et des spectres homonucléaires 2D des corrélations ^{13}C-^{13}C à l'aide couplages scalaires TOBSY (parties flexibles).

Les spectres TOBSY obtenus arborent des pics fins et bien résolus et les spectres DARR des pics relativement larges. La raison de l'élargissement des signaux RMN qui nous paraît la plus

probable est la présence d'une hétérogénéité structurale importante au sein de l'échantillon. Les déplacements chimiques des signaux des spectres DARR suggèrent une restructuration très importante de la PrP recombinante qui consiste en sa conversion d'une structure riche en hélice alpha a une structure ne montrant aucune trace d'hélice et qui semble enrichie en feuillets beta. Ce résultat est en accord avec des études RMN précédentes et avec des données obtenues par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Will et al., 2009 ; Muller *et al*., 2014). La présence simultanée de signaux tryptophane dans le spectre DARR et de signaux correspondant à un ou des résidus alanine et valine dans le spectre TOBSY soulève un questionnement. En effet le dernier tryptophane de la séquence se situe en position 102, ensuite il n'y en a plus dans la séquence. On sait par plusieurs travaux mais aussi par l'observation AFM (Fig. 19) et par une certaine résistance aux protéases (Fig. 27) que le cœur amyloïde de la fibre se situe dans la partie C-terminale et que la partie N-terminale de la PrP reste flexible. La présence d'au moins un Trp dans le spectre rigide suggère fortement que, cette partie rigide s'étend en N-terminal au moins jusqu'à la position 102 (comme le segment de 16kDa visible après digestion douce de la fibre par la PK ou comme pour la partie résistante aux protéases de la plupart des prions formés in vivo ou dans les cultures de cellules) et cela au moins pour une partie des fibres de l'échantillon. Mais comment alors expliquer la présence des signaux Val et Ala dans le spectre flexible alors que ces résidus n'apparaissent pas avant la position 115 et 116 dans la séquence et devraient donc être inclus dans le cœur rigide, de plus d'autre auteurs proposent que la région (113-120) soit exposée au solvant et n'est pas incluse dans le cœur rigide de la fibre (Tycko et al., 2010 ; Sun et al., 2007). A cela deux possibilités la première serait qu'il existe aussi dans l'échantillon des fibres dont la partie riche en feuillet beta commence plus en aval dans la séquence de la PrP, dans ou après le palindrome 115-VAGAAAAGAV-124 cette théorie est en accord avec les résultats de Bocharova et collaborateur qui suggèrent que la PrP existe sous deux conformations différentes séparées par une barrière énergétique importante et qui semblent se distinguer par la résistance ou la sensibilité a la PK de leur région (97-140) (Bocharova et al., 2006). La deuxième serait qu'à l'intérieur même du segment 102-234 il y aurait des zones plus flexibles notamment autour des position 115 et 116, la région 115-155 a d'ailleurs été décrite par certain auteur comme une région relativement flexible comprenant une possible hélice résiduelle (Muller *et al*., 2014)

Avec les données obtenues du fait de la superposition des signaux avec des déplacements chimiques proches nous avons uniquement réalisée une attribution type spécifique des signaux, l'ajout d'une troisième dimension aurait permis de résoudre cette superposition mais il a été

impossible d'obtenir des spectres de corrélation ^{15}N-^{13}C avec une bonne résolution en azote 15. Une réduction de l'hétérogénéité structurale au sein de l'échantillon permettrait néanmoins l'obtention de signaux RMN plus fins. La réduction de l'hétérogénéité structurale de nos fibres de PrP recombinante est devenue l'un des objectifs de cette étude. Nous avons imaginé trois méthodes pour atteindre ce but, la première consiste à sélectionner par amorçage et enrichissement la conformation la plus favorable d'un point de vue cinétique, la deuxième à réduire la séquence de la PrP recombinante et la troisième à sélectionner après maturation (annealing) les structures les plus résistantes au traitement PK.

La première approche consiste en une homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196 par amorçage de la réaction avec l'introduction d'un pourcentage de fibres déjà formé. Ce type d'approche a déjà donné des résultats positifs pour la résolution par RMN de la structure de certaines fibres recombinantes d'Aß (Wälti et al., 2016) par sélection à chaque cycle de production de l'espèce la plus favorable cinétiquement. En théorie l'utilisation d'une amorce permet d'imposer certaines contraintes structurales permettant d'aboutir à de nouvelles structures, de plus en sélectionnant à chaque cycle l'espèce la plus favorable cinétiquement nous mettons les différents conforméres en compétition pour le substrat de PrP recombinante disponible. Nous avons rencontré une certaine difficulté pour trouver des conditions permettant une distinction nette entre la fibrillation spontanée et celle induite par l'amorce, l'étape de nucléation étant déjà facilitée par la mutation Δ190-196 (fig1 A et B partie 2). Finalement c'est en modifiant l'agitation un facteur qui impacte la vitesse de formation des fibres de PrP mutante comme nous l'avons indiqué précédemment dans la partie 2 (Fig1 E) ou qui peut même modifier la forme des fibres (Makarava et Baskakov., 2008) que nous avons réussi à minimiser la fibrillation spontanée au profil de celle initiée par l'amorce. Cependant bien qu'une agitation continue a 240 rpm soit adaptée à notre stratégie elle a abimé le lecteur de plaque SAFAS qui ne semble pas supporter ces conditions. Afin de réaliser cette expérience il nous aurait fallu refaire des tests avec une agitation discontinue supportée par l'appareil où refaire l'expérience sur un autre appareil qui supporterait nos conditions. Nous n'avons pas été en mesure de préparer dans les temps une quantité suffisante d'échantillon homogénéisé par amorçage et marquée aux isotopes lourd C^{13} N^{15} adapté à une étude par RMN du solide.

Dans le cadre de la deuxième approche nous avons analysé par RMN du solide des fibres de PrP recombinante Δ190-196 tronquées de la partie N-terminale (113-234), le caractère infectieux de ces fibres a été étudiée dans la partie 2 ce qui rend leur étude structurale d'autant plus intéressante. Il ressort de cette analyse que les spectres obtenus pour la partie rigide se

superposent bien avec ceux des fibres de pleine longueur ce qui suggère que les deux structures sont relativement proches, néanmoins nous avons observé certaines différences (Iso, Thr et Arg) suggérant des différences structurales concernant la région C-terminale de la protéine, potentiellement à partir du résidu Arg 139. La diminution de la séquence a eu pour conséquence la perte d'un nombre important de signaux ainsi qu'une diminution du rapport signal/bruit ce qui peut s'expliquer par une diminution de la rigidité des fibres ou une augmentation de l'hétérogénéité structurale. Bien qu'en théorie, en absence de toutes contraintes le nombre de conformères que peut aborder une protéine dans l'espace est directement proportionnel à sa séquence, la séquence 113-234 semble à elle seule coder pour un nombre plus important de structures que son homologue pleine longueur, ce qui pourrait suggérer que la partie délétée (23-112) pourrait restreindre la diversité structurale des fibres de PrP via les interactions existant au seins de la protéine et/ou via les propriété biochimique quelle confère. De plus il est possible qu'une grande partie de la diversité structurale observée soit portée par la partie C-terminale. En définitive tenter de restreindre l'hétérogénéité des fibres de PrP en réduisant la séquence de la PrP pour former des fibres ne semble pas être une approche prometteuse.

La troisième approche qui consiste à sélectionner les structures résistances à la PK a permis l'obtention en RMN du solide de pics plus fins et mieux résolus, une augmentation globale du rapport signal/bruit ainsi que l'apparition d'un nombre important de signaux notamment des signaux de carbones aromatiques (105-135 ppm) et des chaines latérales d'arginine qui donne pourtant un signal dipolaire plus faible du fait de leur flexibilité. Cependant ce gain de signal n'a pas été suffisant pour permettre l'obtention de spectres de corrélation ^{15}N-^{13}C avec une bonne résolution en azote 15.

Des structures PK résistantes semblent préexister dans les fibres non traitées ainsi avec un traitement PK:PrP de 1:50 on retrouve les trois fragments caractéristiques de 16Kd, 12Kd et 10Kd mais avec un pourcentage de fibres PrP^{res} de seulement 7%. La maturation en présence de triton semble par un mécanisme encore inconnu à ce jour augmenter la proportion de structures PK résistantes dans l'échantillon tout en conservant majoritairement les trois bandes de 16Kd, 12Kd et 10Kd. Le traitement par l'anticorps F99/97.6.1 (épitope 220-225) a permis de mettre en évidences que les 3 fragments majoritaires sont tous C-terminaux (**Figure 27**). Une étude réalisée sur des fibres recombinantes de PrP traitées au triton et digérées à la PK suggère que le fragment de 16Kd débute au niveau du résidu Gln101 (Bocharova et al., 2006) ce qui concorde avec nos résultat RMN qui nous permettent d'observer la présence de signal Trp suggérant ainsi que le fragment long inclue au minimum le résidu Trp 102. Un éventuel

effet de la maturation permettant de structurer la partie décrite comme relativement mobile autour du palindrome VAGAAAAGAV est envisageable surtout que la bande de 16Kd est fortement augmentée lors d'un traitement triton a 70°C. Finalement bien que l'amélioration du signal suggère une possible réduction de l'hétérogénéité structurale et donc une sélection de structures, les signaux RMN des spectres des fibres traitées et non traitées se superposent bien. Ceci sous-entend que la diversité structurale est certes suffisante pour gêner une étude de la structure des fibres de PrP par RMN du solide mais qu'au finale les différents conforméres possèdent des structures relativement proches.

5. Conclusion

Une première étude par RMN du solide de fibres infectieuses formées à partir de PrP mutées Δ190-196 a permis d'observer une restructuration très importante de la partie C-terminal de la protéine qui consiste en sa conversion d'une structure riche en hélice alpha a une structure ne montrant aucune trace d'hélice et qui semble enrichie en feuillets beta. Elle a aussi permis l'observation d'une importante hétérogénéité structurale au sein des fibres amyloïdes de PrP ainsi qu'une possible diversité concernant la taille de leur partie riche en feuillet beta. Une deuxième étude de ces fibres par RMN après maturation et traitement a la PK a permis de réduire l'hétérogénéité structurale de ces fibres en sélectionnant uniquement les structures résistantes, cette homogénéisation se traduit par une amélioration du rapport signal/bruit en RMN et l'obtention de signaux plus fins et mieux résolus. Les signaux obtenus se superposent cependant bien avec ceux des fibres non traitées. L'études des fibres Δ190-196 tronquées à la taille du fragment C1 (113-234) par RMN du solide indique que leur structure bien que proche de celle des fibres de pleine longueur présente quelques différences dans la partie C-terminal riche en feuillet beta. Une baisse du rapport signal/bruit en RMN suggère une perte de rigidité ou une augmentation de l'hétérogénéité au sein de ces fibres.

6. Perspectives

Les perspectives de ce travail seront premièrement de pouvoir poursuivre l'étude structurale des fibres de PrP Δ190-196. Étant donnée l'effet de l'agitation sur la structure des fibres, il serait déjà intéressant d'étudier par RMN du solide les fibres de PrP obtenues en absence d'agitation. D'une part afin d'examiner si ces fibres qui possèdent une morphologie différente des fibres obtenues sous agitation présentent aussi des différences au niveau des structure

tertiaire et secondaire, d'autre part les conditions de fibrillation étant différentes un possible impact sur l'hétérogénéité structurale est possible. Une étude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) sur les fibres PK^{res} et sur les fibres tronquées C1 Δ190-196 serait intéressante afin de confirmer les différences observées en RMN du solide entre les fibres C1 et pleine longueur et d'observer d'éventuelles différences qui ne seraient pas apparues en RMN entre les fibres traitées PK^{res} ou non. Dans la même idée, une première étude par dichroïsme circulaire a déjà été entreprise sur ces fibres.

Afin d'obtenir de meilleurs résultats par RMN du solide il serait aussi intéressant de poursuivre notre approche d'homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196. Tenter une sélection cinétique par amorçage successif avec une agitation douce qui permet de favoriser une fibrillation initiée par l'amorce a une fibrillation spontanée nous paraît être une approche prometteuse. Il serait aussi intéressant d'utiliser le prion spontané (PrP^{Sc}) ou des fibres PK^{res} comme amorce afin d'étudier un possible impact sur l'infectivité ou la PK résistance des fibres et éventuellement une sélection de structure. Finalement, coupler les deux approches d'homogénéisation en effectuant une sélection par amorçage suivie par une maturation par triton et une digestion par la PK permettrait une potentielle sélection plus efficace.

Une deuxième perspective intéressante consisterait à étudier plus en détail le mécanisme de maturation au Triton X100 qui a permis d'augmenter la résistance à la PK des fibres de PrP. Ce phénomène semble se produire en présence d'homogénat de cerveau ou de lysats de cellules même en absence de Triton. Étant donné que les polyanions semblent atténuer la maturation (Bocharova *et al*., 2006) nous avons suspecté un possible effet des lipides qui semble d'ailleurs capable de déstabiliser les fibres de PrP (Klein *et al*., 1998). Nous avons effectué des premières expériences de maturation en présence de POPG un lipide qui interagit avec la PrP recombinante (Wang et al., 2007) et le GM1 qui semble interagir avec la PrP^{c} dans les cellules de neuroblastome (Mattei *et al*., 2002) et qui a servi de cofacteur pour la formation in vitro d'un prion synthétique à partir de PrP recombinante (Kim *et al*., 2018). Les résultats suggèrent que ces lipides permettent une augmentation de la PK résistance ressemblant à celle observée avec le triton. Étant donné que la PrP^{c} est naturellement exposée aux lipides et que ces derniers sont souvent ajoutés aux techniques d'amplification in vitro tel que la PMCA sous forme d'homogénat de cerveau nous nous questionnons sur un rôle potentiel des lipides dans l'acquisition de la PK résistance des prions.

IV. Discussion générale de la thèse

Ce travail de thèse décrit un parcours qui commence avec l'émergence d'un prion qui se forme spontanément dans des cellules en culture. Il s'est ensuite poursuivi par la préparation de fibres amyloïdes à partir d'une PrP recombinante comportant la même mutation que celle du prion spontané. Ces fibres amyloïdes se sont avérées capables d'induire une transconformation de la PrP homologue exprimée dans la cellule vers sa forme prion. Une analyse structurale par RMN du solide des fibres a ensuite été entreprise. Nous allons ici reprendre ce parcours en détail et discuter les éléments novateurs apportés par ce travail.

Il faut d'abord rappeler que le concept prion s'applique à un élément protéique qui peut se retrouver sous deux conformations très différentes, l'une de ces deux formes, la forme dite prion, étant capable de convertir l'autre forme par simple contact en lui faisant adopter sa propre structure. L'archétype en est le prion des mammifères qui est responsable de maladies neurodégénératives transmissibles chez l'homme et l'animal. Les prions sont des agents pathogènes encore incomplètement compris à ce jour. Les mécanismes impliqués dans leur réplication, leurs structures, l'origine de leur toxicité ainsi que les mécanismes permettant leur émergence spontanée sont autant de sujets de recherche fascinants suscitant encore beaucoup d'interrogations. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes concentrés sur l'étude d'une délétion de sept acides aminés dans une région très conservée de la PrP. Nous avons effectué cette délétion dans une PrP^{que} nous avons fait exprimer en cellule mais également dans la PrP recombinante homologue produite par *E. coli* pour pouvoir ensuite générer et étudier les fibres amyloïdes de cette PrP mutante.

Dans une première étape nous avons étudié l'effet de la délétion des résidus 190-HTVTTTT-196 de la PrP ovine dans un modèle cellulaire. Cette étude s'est appuyée sur les résultats de travaux antérieurs visant à déterminer l'effet sur la réplication des prions d'une délétion de quatre thréonines (193-TTTT-196) situées à la fin de l'hélice H2 de la PrP^{C}. Ces résultats indiquaient que la délétion permettait la conversion en prion consécutive à une infection par un prion exogène et facilitait même la propagation de certaines souches difficiles à propager en culture de cellule. Cela montrait que la présence des quatre thréonines n'était pas nécessaire à la formation d'une structure prion et pouvait même dans une certaine mesure défavoriser la conversion de la PrP^{c} vers une forme PrP^{Sc} (Munoz-Montesino *et al.*, 2017). Cette région étant

apparemment importante pour le maintien de la forme normale de la protéine, nous avons étendu la délétion aux trois résidus en amont 190-HTV-192. Ces résidus sont très conservés chez les mammifères et retrouvés associés à des mutations pathogènes dans la PrP humaine (H187R, T188K, et V189I) (Colluci *et al*., 2006 ; Finckh *et al*., 2000 ; Di Fede *et al*., 2019 ; Kotta *et al*., 2006). Nous avons exprimé la PrP ovine Δ190-196 dans des cellules RK13 ce qui a mené à l'apparition spontanée dans ces cellules d'une PrP^{Sc} agrégée, insoluble résistante aux protéases et qui s'auto-propage et se transmet à d'autres cellules. Ce prion spontané que nous appelons Δ^{Spont} s'est de plus avéré infectieux pour un clone cellulaire particulier capable d'exprimer la protéine mutée sans former spontanément de prion, mais aussi pour des cellules qui expriment le fragment C1 muté sans produire de prion spontané ou des PrP avec des mutations proches ne formant pas non plus spontanément de prion. L'apparition d'un prion spontané est normalement un événement rare car il nécessite la formation de noyaux de PrP^{Sc} suffisamment stables pour initier le processus de polymérisation (Mead *et al*., 2019. La conversion spontanée de la PrP^{c} vers sa forme PrP^{Sc} étant défavorable d'un point de vue thermodynamique elle représente l'étape limitante du processus (Landsbury et Caughey., 1995). Cependant on a recensé plus d'une trentaine de mutations dans la séquence de la PrP humaine qui provoquent la conversion spontanée de la PrP et sont responsables des formes familiales d'ESST.

Afin de déterminer des raisons éventuelles à l'émergence du prion Δ^{Spont} nous avons étudié l'impact de la délétion 190-HTVTTTT-196 sur la structure de la PrP. La délétion n'affecte pas le repliement global de la protéine : une étude précédente réalisée par RMN sur une PrP mutante (Δ190-197) montre que la délétion n'a pas d'impact majeur sur sa structure (Munoz-Montesino *et al*., 2016). La comparaison par dichroïsme circulaire de la PrP Wt avec la PrP Δ190-196 suggère une conservation des structures secondaires. Cependant en dépit de son faible impact sur le repliement global, la délétion Δ190-196 réduit la stabilité de la PrP que ce soit pour la protéine de pleine longueur ou tronquée 113-234, correspondant à la taille du fragment C1. Cette baisse de stabilité nous donne un élément possible de réponse car elle permettrait de réduire le niveau d'énergie nécessaire à la conversion en facilitant le dépliement de la PrP^{c}. La mutation pourrait aussi agir en augmentant la stabilité des assemblages de PrP^{Sc} mais nous n'avons pas exploré cet aspect. De plus la présence de quelques rares clones exprimant la PrP Δ190-196 mais ne formant pas de prion spontané indique l'implication dans le processus de certains facteurs cellulaires encore méconnus.

La PrP^{Sc} correspondant au prion Δ^{Spont} semble posséder une structure très atypique car elle présente un profil électrophorétique non conventionnel et complexe avec une bande prédominante à 14kDa qui correspond à la taille du fragment C1 de la PrP, ce qui est exceptionnel pour un prion. Le prion Δ^{Spont} s'est d'ailleurs avéré incapable d'infecter des cellules exprimant la PrP sauvage, peut-être en raison d'une incompatibilité de la PrP sauvage à adopter la structure du prion Δ^{Spont} à cause de la différence de la séquence primaire ou parce qu'elle n'a pas dans son portefeuille conformationnel d'équivalent possible à la conformation adoptée par le prion spontané. Par ailleurs l'implication d'éventuels facteurs cellulaires qui pourraient faciliter la conversion de la PrP mutante par rapport à celle de la PrP sauvage dans le cadre d'une infection par Δ^{Spont} est également envisageable.

Outre la bande 14 kDa de la taille du C1 la PrP^{res} Δ190-196 présente aussi une bande de 16 kDa moins intense et qui est proche et peut-être légèrement plus courte que la PrP^{res} des prions de type 2. De façon beaucoup plus minoritaire on observe aussi des fragments plus grands de PrP^{res} qui pourraient correspondre à ceux produits par les prions de type 1. Ce profil non conventionnel et complexe a été retrouvé aussi bien dans des populations générales que dans des clones cellulaires exprimant la PrP mutante et produisant le prion spontané. La PrP^{res} du prion Δ^{Spont} suggère donc une organisation structurale originale et son profil pourrait s'expliquer par la conversion de deux substrats. Ainsi en plus de convertir la protéine de pleine longueur, comme c'est le cas pour les prions classiques, le prion $\Delta^{Spont\ serait}$ aussi en mesure de convertir le fragment C1.

L'existence du fragment C1 de la PrP est la conséquence d'une coupure de la partie N-terminale de la protéine par des métalloprotéases et cette partie C-terminale de la PrP est ancrée à la surface cellulaire. Le consensus actuel est que le fragment C1 de la PrP^{C} n'est pas convertible probablement parce qu'il est plus court que le domaine PrP^{res} des prions (Fischer *et al*., 1996 ; Westergard *et al*., 2011). Il pourrait même avoir le rôle d'inhibiteur compétitif vis-à-vis de la conversion de la PrP^{C} (Westergard *et al*., 2011 ; Lewis *et al*., 2009). Ce dernier point nous paraît cependant très discutable. Nous avons montré que la partie C1 de la PrP Δ190-196 exprimée dans la cellule sans la PrP de pleine longueur était convertie par le prion Δ^{Spont} en une forme résistante aux protéases présentant les caractéristiques typiques d'un prion. Notamment ce prion C1 est transmissible *de novo* aux cellules qui expriment soit la même protéine C1, soit la PrP mutante homologue pleine longueur ou des PrP mutantes proches. À notre connaissance, il s'agit de la première observation d'une conversion d'un fragment C1 vers une forme prion.

Cette conversion a été rendue possible par le fait que la structure imposée par Δ^{Spont} est atypique et ne nécessite pas de toute la région correspondant aux prions formés par la PrP pleine longueur ou s'accommode d'un cœur résistant aux protéases plus court que les prions classiques. Par ailleurs la délétion 190-HTVTTTT-196 a pu modifier certaines propriétés physicochimiques du fragment C1, notamment sa stabilité. C'est peut-être la combinaison de ces deux éléments, qui sont intrinsèquement liés ici, qui a permis la formation d'un prion de type C1.

Les prions Δ^{Spont} et Δ190-196 $C1^{Sc}$ générés dans ce travail sont donc des entités prions originales et attrayantes qui méritent d'être étudiées plus avant avec des modèles de souris transgéniques dans le cadre de la recherche sur les maladies infectieuses.

Dans un deuxième temps, nous avons décidé d'introduire la délétion 190-HTVTTTT-196 dans une PrP recombinante exprimée dans *E. coli*. Puisque la délétion semble faciliter la conversion spontanée de la PrP^c en cellule nous voulions évaluer son impact en absence de facteurs cellulaires sur la conversion spontanée de la PrP recombinante en fibres amyloïdes *in vitro*, ainsi que sur la capacité de ces fibres à convertir une PrP^c mutée ou sauvage. Nous souhaitions aussi savoir si ces fibres Δ190-196 seraient elles aussi capables d'induire la conversion du fragment C-terminal correspondant au C1 de la PrP mutée.

Nous avons observé un effet de la délétion 190-HTVTTTT-196 sur la phase de nucléation qui est l'étape limitante dans la formation de fibres amyloïdes. En effet la phase de latence correspond à la formation du noyau de polymérisation initiant le processus de fibrillation. Elle est significativement plus courte pour la PrP Δ190-196 que pour la PrP sauvage. De plus dans les mêmes conditions réactionnelles, mais en absence d'agitation, la PrP Δ190-196 a formé des fibres alors que la PrP sauvage n'a montré aucun signe de conversion. La diminution de la stabilité de la protéine par la délétion a sans doute joué un rôle positif dans cette conversion spontané *in vitro*. Bien qu'un parallèle direct entre cette observation et la formation spontanée du prion dans les cellules exprimant la PrP mutée ne peut être établi de manière certaine, les molécules se trouvant dans des contextes très différents, les deux observations vont dans le même sens d'une possible réduction de l'énergie d'activation nécessaire au processus de conversion, facilitant ainsi le changement de conformation entre les deux états de la protéine.
Une fois les fibres formées nous avons entrepris d'évaluer leur potentiel infectieux sur deux lignées cellulaires Rov exprimant la PrP^c mutée Δ190-196 mais ne formant pas spontanément de prion même après plusieurs mois de culture. Les fibres Δ190-196 induisent la conversion de

la PrP^C homologue vers un état résistant aux protéases non seulement dans un clone cellulaire exprimant la protéine mutée de pleine longueur mais également dans une population de cellules RK13 exprimant uniquement la partie C1 de la PrP Δ190-196. En revanche, l'exposition de ces mêmes cellules à des fibres Wt n'induit pas la conversion de la PrP mutante ou de son fragment C1. De plus les fibres Δ190-196 ne sont pas capables d'induire la conversion de la PrP^C sauvage. Tous ces éléments indiquent la spécificité de cette conversion et qu'un simple contact avec un assemblage amyloïde n'est pas suffisant pour convertir la PrP mutante ou son fragment C1. Une certaine compatibilité de séquence et/ou de structure doit exister entre la PrP^C et les fibres infectantes pour permettre la conversion.

La PrP^{Sc} obtenue suite à une infection par les fibres de PrP mutante présente les caractéristiques typiques d'un prion : résistance aux protéases, insolubilité et infectivité. La PrP^{res} accumulée dans les cellules a des caractéristiques proches ou similaires à celles du prion spontané même si les taux obtenus sont la plupart du temps très inférieurs. Le profil PrP^{res} correspond aussi à deux polypeptides de 16kDa et 14kDa bien qu'une inversion du rapport quantitatif des bandes ait été notée à certaines occasions. L'introduction de la délétion 190-HTVTTTT-196 dans la PrP recombinante a donc bien permis la formation de fibres amyloïdes générées *in vitro* capables de convertir la PrP cellulaire homologue en prion.

La partie N-terminale intrinsèquement désordonnée bien que présente dans les fibres amyloïdes de la PrP mutante reste sensible aux protéases et comme pour les prions ne semble pas nécessaire pour l'infectivité. Ainsi des fibres amyloïdes d'une PrP double mutante (Δ25-102 ;Δ190-196) c'est-à-dire dépourvue de sa partie N-terminale convertissent encore efficacement la PrP mutante entière et son fragment C-terminal C1.

Nous avons ensuite testé si le prion synthétique formé *in vitro* pouvait comme le prion Δ^{Spont} produire la conversion du fragment C-terminal C1 de la PrP mutée. Pour ce faire nous avons utilisé des cellules exprimant le segment C-terminal (113-234, Δ190-196) en absence de la PrP de pleine longueur. L'exposition de ces cellules à des fibres de C1 recombinant homologue, comme à celle des fibres de PrP mutante de pleine longueur, a permis la conversion du segment $C1_{113}$ vers un état résistant aux protéases et infectieux pour des cellules naïves, c'est-à-dire comme pour une infection par le prion spontané, la formation d'un prion de type C1.

Dans une troisième étape, une fois le caractère infectieux de ces fibres établi, nous nous sommes intéressés à leur caractérisation structurale par RMN du solide, l'étude d'un prion synthétique présentant plus d'intérêt pour une approche de la structure de molécules de type prion que celle de fibres non infectieuses.

Nous avons d'abord analysé des fibres de PrP Δ190-196 de peine longueur. Les spectres TOBSY obtenus qui correspondent aux parties flexibles, arborent des pics fins et bien résolus alors les spectres DARR (parties rigides) présentent des pics relativement larges. La raison de l'élargissement des signaux RMN est probablement due à une hétérogénéité structurale importante du cœur rigide des fibres au sein de l'échantillon. Les déplacements chimiques des signaux des spectres DARR suggèrent malgré cela une restructuration très importante de la PrP recombinante consistant en une conversion de sa structure riche en hélice alpha en une structure ne montrant plus aucune trace d'hélice et qui semble enrichie en feuillets beta. Ce résultat est en accord avec des études RMN précédentes et avec des données obtenues par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Will et al., 2009 ; Muller *et al*., 2014).

Par ailleurs la présence simultanée de signaux tryptophane dans le spectre DARR et de signaux correspondant à un ou des résidus alanines et valines dans le spectre TOBSY soulève une question. En effet les derniers tryptophanes de la séquence se situe en position 93 et 102. On sait par plusieurs travaux mais aussi par l'observation AFM et par une certaine résistance aux protéases que le cœur amyloïde de la fibre se situe dans la partie C-terminale et que la partie N-terminale de la PrP reste flexible. La présence d'au moins un Trp dans le spectre rigide suggère fortement que le cœur rigide des fibres peut remonter au moins jusqu'au dernier résidu Trp en position 102, ce qui pourrait correspondre au fragment de 16kDa obtenu après digestion des fibres par la PK. Par contre des signaux Val et Ala sont visibles dans le spectre flexible alors que ces résidus n'apparaissent pas avant la position 115 et 116, c'est-à-dire en aval de la position 102. L'explication qui nous semble la plus probable est l'existence au sein de l'échantillon d'au moins deux conformations différentes, une conformation longue avec une partie riche en feuillet beta couvrant le résidu 102 et une conformation courte avec partie riche en feuillet beta débutant dans ou en aval du palindrome 115-VAGAAAAGAV-124. Cette hypothèse est en accord avec des observations antérieures suggérant que dans un même échantillon, les fibres de PrP de souris peuvent exister sous deux conformations différentes se distinguant par leur résistance ou leur sensibilité à la digestion par la PK de la région 97-140 ce

qui produit à la fois un fragment de 16kDa et d'autres aux alentours de 10-12 kDa, comme c'est le cas ici aussi (Bocharova et al., 2006).

Avec les données que nous avons obtenues et du fait de la superposition des signaux avec des déplacements chimiques proches, nous n'avons pu réaliser qu'une attribution « type spécifique » des signaux. L'ajout d'une troisième dimension aurait permis de résoudre cette superposition et de faire un assignement des résidus avec leur position dans la séquence protéique, mais nous n'avons pas pu obtenir de spectres de corrélation ^{15}N-^{13}C avec une bonne résolution en azote 15. Une réduction de l'hétérogénéité structurale au sein de l'échantillon devrait permettre d'obtenir des signaux RMN plus fins permettant un meilleur assignement. La réduction de l'hétérogénéité structurale de nos fibres de PrP recombinante est donc devenue l'un des objectifs de cette étude. Nous avons imaginé trois méthodes pour atteindre ce but. La première consiste à sélectionner par amorçage et enrichissement la conformation la plus favorable d'un point de vue cinétique, la deuxième à réduire la séquence de la PrP recombinante à sa partie C-terminale correspondant au C1 et la troisième à sélectionner après maturation (« annealing ») les structures les plus résistantes au traitement PK.

La première approche a consisté à mettre au point une procédure permettant de sélectionner une structure de fibre se formant plus rapidement que les autres après amorçage de la réaction avec des fibres déjà formées. Ce type d'approche a déjà donné des résultats pour la résolution par RMN de fibres recombinantes d'Aß (Wälti et al., 2016). En modifiant l'agitation, un facteur qui impacte la vitesse de formation, nous avons établi des conditions permettant de minimiser la fibrillation spontanée de la PrPΔ190-196 au profit de celle initiée par l'amorce, permettant ainsi une sélection efficace des espèces structurales « les plus rapides ». Dans le cadre de cette thèse nous n'avons pas été en mesure de préparer dans les temps une quantité suffisante d'échantillon homogénéisé par amorçage et marqué aux isotopes actifs en RMN pour une étude par RMN du solide. Nous pensons cependant que cette approche est prometteuse et qu'elle mériterait d'être prise en considération dans les futures études structurales des fibres de PrP.
La deuxième approche a consisté à analyser les fibres produites uniquement avec la partie C-terminale correspondant au fragment C1 (113-234) de la PrP Δ190-196. Ces fibres se comportent elles aussi comme un prion synthétique en culture de cellule. Il ressort de cette analyse que les spectres obtenus pour la partie rigide se superposent bien avec ceux des fibres de pleine longueur, ce qui suggère que les deux structures sont relativement proches. Des différences sont cependant observables. La réduction de la séquence de la PrP semble avoir

provoqué une augmentation de l'hétérogénéité structurale des fibres. Il se pourrait que la partie absente (23-112) restreigne dans une certaine mesure la diversité structurale des fibres, peut-être via des interactions au sein de la protéine et/ou à cause de ses propriétés biochimiques. Il est également possible qu'une grande partie de la diversité structurale observée dans les fibres de PrP pleine longueur soit en fait portée par la partie C-terminale. En définitive tenter de restreindre l'hétérogénéité des fibres de PrP en réduisant la séquence de la PrP ne semble pas être une approche prometteuse.

La troisième approche a consisté à sélectionner les structures résistances à la PK. Une certaine proportion des fibres de PrP présente une résistance à la PK, permettant d'établir un profil avec trois bandes majeures 16-kDa, 12-kDa et 10kDa correspondant à environ 7% de la masse des fibres Δ190-196. Un traitement au triton à 37°C augmente fortement cette proportion tout en maintenant le profil, alors qu'un traitement à 70°C augmente très fortement l'importance relative de la bande de 16-kDa. Le mécanisme des effets du triton n'est toujours pas connu à ce jour, mais paraît correspondre à une rigidification accrue des structures. Nous avons utilisé le traitement à 37°C suivi du traitement PK permettant d'obtenir en quantité suffisante les structures les plus résistantes correspondaient à des partie C-terminale plus ou moins étendues. Ces cœurs de fibres ont été analysés par RMN du solide. Cela a permis d'obtenir une augmentation globale du rapport signal/bruit, des pics apparemment plus fins et mieux résolus que précédemment ainsi que l'apparition d'un nombre important de signaux notamment des signaux de carbones aromatiques (105-135 ppm) et des chaînes latérales d'arginine qui donnent pourtant un signal dipolaire plus faible du fait de leur flexibilité. Cependant ce gain de signal n'a pas été suffisant pour permettre l'obtention de spectres de corrélation ^{15}N-^{13}C avec une bonne résolution en azote 15 permettant une assignation des résidus. Là encore semble persister une certaine hétérogénéité structurale qui ne permet pas une analyse structurale poussée. Au bout du compte il semble que seule la sélection d'une structure particulière, peut-être associée à un traitement triton et une digestion PK pour isoler le cœur de la fibre, pourrait permettre de résoudre la structure d'une fibre amyloïde de PrP par RMN du solide.

V. Conclusion générale

La première partie de ce travail a permis de générer un nouveau type de prion capable d'émerger spontanément d'une culture cellulaire et de s'y propager via la conversion de la PrP mutante Δ 190-196 de pleine longueur ou de son fragment C-terminal C1. Nous avons ainsi démontré que les 113 ou 115 résidus de l'extrémité C-terminale de la PrP sont suffisants pour constituer une entité prion auto-réplicative et transmissible. Nos résultats suggèrent également que la séquence conservée HTVTTTT dans l'extrémité C-terminale de l'hélice alpha 2 de la PrP est importante pour la stabilité de la protéine prion. Ce travail a également fourni un modèle unique de culture cellulaire permettant l'étude des facteurs cellulaires impliqués dans la formation spontanée des prions.

La deuxième partie du travail a permis d'établir que l'introduction d'une délétion Δ190-196 dans une PrP recombinante permet la formation de fibres amyloïdes capables de convertir en prion la protéine mutante homologue exprimée dans des cellules. La PrP^{Sc} obtenue après conversion forme un prion non-conventionnel possède des caractéristiques proches de celles du prion spontané Δ^{Spont}. L'exposition des mêmes cellules à des fibres amyloïdes de PrP ovine sauvage ne permet pas la conversion et les fibres mutantes sont incapables de convertir la PrP^{C} Wt soulignant ainsi la spécificité de la conversion. Par ailleurs, de même que le prion Δ^{Spont} les fibres Δ190-196 de pleine longueur ainsi que celles générées avec seulement la partie C-terminale de la PrP recombinante équivalente au fragment C1 permettent la conversion en prion du C1 homologue exprimé dans les cellules.
La troisième partie s'est concentrée sur la caractérisation structurale des fibres amyloïdes de PrPΔ190-196. Une première étude par RMN du solide de ces fibres infectieuses a permis d'observer une restructuration très importante de la partie C-terminale de la protéine qui consiste en sa conversion d'une structure riche en hélice alpha a une structure ne montrant aucune trace d'hélice et qui est enrichie en feuillets beta. Cette étude a aussi mis en évidence une importante hétérogénéité structurale au sein des fibres amyloïdes de PrP ainsi qu'une possible diversité concernant la taille de leur partie riche en feuillet bêta. Une deuxième étude de ces fibres par RMN après maturation et traitement a la PK a permis de réduire l'hétérogénéité structurale de ces fibres en sélectionnant uniquement les structures résistantes, cette homogénéisation se traduit par une amélioration du rapport signal/bruit en RMN et l'obtention de signaux plus fins et mieux résolus, avec des signaux qui se superposent bien avec ceux des

fibres non traitées. La résolution de ces structures s'est heurtée à un problème d'hétérogénéité des fibres amyloïde qui n'est pas sans rappeler la capacité de cette protéine à produire de multiples souches de prion.

VI. Perspectives générales de la thèse

Elles sont nombreuses et les trois principales (1-3) requièrent des moyens humains et financiers importants.

1- Construire des souris transgéniques pour la PrPΔ190-196 et/ou son fragment C1.

L'objectif principal est de déterminer la pathogénicité du prion Δ^{Spont}. Nous avons montré que ce prion ne se propage pas sur la PrP sauvage dans les cellules, et il en est de même pour les souris transgéniques ovines. Cela permettra de déterminer si la PrP mutante produit ou non un prion spontané *in vivo*, à quel stade du développement, dans quels tissus, et avec une pathogénicité semblable ou différente à celle des souches de prions plus classiques. Cela nous permettrait aussi de tester *in vivo* l'infectivité des fibres amyloïdes mutantes et particulièrement des cœurs PK résistants de ces fibres.

2- Poursuivre l'approche d'homogénéisation des fibres amyloïdes pour l'analyse par RMN du solide et/ou envisager une approche par Cryo-EM.

Afin d'obtenir de meilleurs résultats par RMN du solide il serait aussi intéressant de poursuivre notre approche d'homogénéisation des fibres de PrPΔ190-196. Tenter une sélection cinétique par amorçage successif avec une agitation douce qui permet de favoriser une fibrillation initiée par l'amorce à une fibrillation spontanée nous paraît être une approche prometteuse. Il serait aussi intéressant d'utiliser le prion spontané (PrP^{Sc}) ou des fibres PK^{res} comme amorce afin d'étudier un possible impact sur l'infectivité ou la PK résistance des fibres et éventuellement une sélection de structure. Finalement, coupler les deux approches d'homogénéisation en effectuant une sélection par amorçage suivie par une maturation par triton et une digestion par la PK permettrait potentiellement une sélection plus efficace. La Cryo-EM permet aussi dans une certaine mesure de sélectionner au niveau de l'analyse les structures similaires dans un échantillon non homogène et pourrait donc être efficace pour l'étude des différentes structures possibles que peuvent adopter les fibres amyloïdes d'une même PrP.

3- Utiliser le modèle cellulaire pour identifier des facteurs partenaires ou inhibiteurs de la conversion spontanée.

Les processus et facteurs cellulaires impliqués dans l'émergence des prions restent inconnus. En comparant le transcriptome de clones permissifs ou non pour la formation spontanée du prion Δ^{Spont} nous pourrions en identifier certains. Étant donné la variabilité chromosomique importante des lignées établies, il faudrait comparer une dizaine de clones permissifs (que nous avons déjà isolés) avec le même nombre de clones non permissifs. Nous ne disposons pas assez de ces derniers qui sont rares et il faudra donc en isoler d'autres, voire idéalement repartir d'un clone RK13 unique pour isoler des sous clones positifs ou négatifs. Le séquençage des ARN ou l'utilisation de puces à ADN pourrait permettre d'identifier des protéines candidates dont l'implication devra ensuite être vérifiée par délétion ou surexpression. Cette approche pourrait ouvrir de nouvelles voies de recherche inexplorées sur les prions de mammifères, notamment dans la mesure où toute une série de processus ou facteurs anti-prion ont été mis en évidence dans la levure (Wickner Int. J. Mol. Sci. 2020).

4- Tester l'effet de la délétion HTVTTTT dans les PrP de différentes espèces.

La construction de plasmides nécessaires à l'expression de PrP mutante de différentes espèces de mammifères avec la délétion concernée est en cours. Nous pourrions exprimer ces PrP mutantes dans les cellules RK13 ou dans d'autres types cellulaires comme la lignée neuronale de souris CAD5 délétées de leur PrP endogène qui ont été produites récemment et pourraient être particulièrement intéressantes (Walia Sci Rep 2019).

5-Identifier d'autres mutations permettant la formation spontanée de prions en cellule.

Le but serait de trouver une mutation plus compatible avec une conversion de la PrP sauvage par infection. Nous avons fait des microdélétions dans la région 190-196 sans obtenir de prion spontané, mais nous souhaitons tester un certain nombre de mutations ponctuelles comme par exemple H190R qui mimerait la mutation humaine H187R (GSS) et étendre ce type d'exploration à l'ensemble de la séquence de la PrP.

6-Mesurer l'infectivité des cœurs résistants à la PK des fibres Δ190-196

Les fibres amyloïdes de PrP présentent une certaine résistance à la PK. Ainsi en digérant avec des quantités modérées de PK les fibres préalablement à l'infection nous pourrions vérifier si le pouvoir infectieux des fibres est bien porté par la partie PK résistante. Éventuellement en utilisant des concentrations croissantes de PK il serait peut-être possible de déterminer la région minimale nécessaire à une infection dans notre système, éventuellement avant et après « annealing ».

7- Étudier plus en détail la maturation des fibres de PrP recombinantes

Une dernière perspective intéressante consisterait à étudier plus en détail le mécanisme de maturation au Triton X100 qui a permis d'augmenter la résistance à la PK des fibres de PrP. Ce phénomène semble se produire en présence d'homogénat de cerveau ou de lysats de cellules même en absence de Triton. Étant donné que les polyanions semblent atténuer la maturation (Bocharova *et al*., 2006) nous avons suspecté un possible effet des lipides qui semblent d'ailleurs capables de déstabiliser les fibres de PrP (Klein *et al*., 1998). Nous avons effectué des premières expériences de maturation en présence de POPG un lipide qui interagit avec la PrP recombinante (Wang et al., 2007) et le GM1 qui semble interagir avec la PrP^c dans les cellules de neuroblastome (Mattei *et al*., 2002) et qui a servi de cofacteur pour la formation *in vitro* d'un prion synthétique à partir de PrP recombinante (Kim *et al*., 2018). Les résultats suggèrent que ces lipides permettent une augmentation de la PK résistance ressemblant à celle observée avec le triton. Étant donné que la PrP^C est naturellement exposée aux lipides et que ces derniers sont souvent présents (homogénats de cerveau ou lysats cellulaires) ou même ajoutés aux techniques d'amplification *in vitro* telles que la PMCA, nous nous questionnons sur un rôle potentiel des lipides dans l'acquisition de la résistance à la PK des prions.

VII. BIBLIOGRAPHIE

Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., Schätzl, H. M., & Ertmer, A. (2009). Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy*, *5*(3), 361-369.

Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annual Review of Neuroscience*, *31*, 439-477.

Aguzzi, A., Heikenwalder, M., & Polymenidou, M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(7), 552-561.

Aguzzi, A., & Sigurdson, C. J. (2004). Antiprion immunotherapy : To suppress or to stimulate? *Nature Reviews. Immunology*, *4*(9), 725-736.

Aguzzi, A., Montrasio, F., & Kaeser, P. S. (2001). Prions: health scare and biological challenge. *Nature reviews Molecular cell biology*, *2*(2), 118-126

Aigle, M., & Lacroute, F. (1975). Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Molecular & General Genetics: MGG*, *136*(4), 327-335.

Allais-Bonnet, A., Castille, J., Pannetier, M., Passet, B., Elzaïat, M., André, M., Montazer-Torbati, F., Moazami-Goudarzi, K., Vilotte, J.-L., & Pailhoux, E. (2016). A specific role for PRND in goat foetal Leydig cells is suggested by prion family gene expression during gonad development in goats and mice. *FEBS Open Bio*, *6*(1), 4-15.

Allais-Bonnet, A., & Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *2*.

Amenitsch, H., Benetti, F., Ramos, A., Legname, G., & Requena, J. R. (2013). SAXS structural study of PrPSc reveals 11 nm diameter of basic double intertwined fibers. *Prion*, *7*(6), 496-500.

Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J.-M., & Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : Influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *The Journal of General Virology*, *83*(Pt 10), 2607-2616

Andrews, N. J., Farrington, C. P., Ward, H. J. T., Cousens, S. N., Smith, P. G., Molesworth, A. M., Knight, R. S. G., Ironside, J. W., & Will, R. G. (2003). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, *361*(9359), 751-752.

Andronesi, O. C., Mintzopoulos, D., Struppe, J., Black, P. M., & Tzika, A. A. (2008). Solid-state NMR adiabatic TOBSY sequences provide enhanced sensitivity for multidimensional high-resolution magic-angle-spinning 1H MR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, *193*(2), 251-258. h

Appleby, B. S., Appleby, K. K., Hall, R. C., & Wallin, M. T. (2010). D178N, 129Val and N171S, 129Val genotype in a family with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, *30*(5), 424-431.

Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2004). Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *Journal of Virology*, *78*(1), 482-490.

Arima, K., Nishida, N., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Yamaguchi, N., Yoshikawa, D., Yoon, J., Watanabe, K., Kobayashi, N., Mouillet-Richard, S., Lehmann,

S., & Katamine, S. (2005). Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures. *Journal of Virology*, *79*(11), 7104-7112.

Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., Welch, J., Hill, A. F., Lloyd, S. E., Wadsworth, J. D. F., & Collinge, J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *The EMBO Journal*, *21*(23), 6358-6366.

Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., & Caughey, B. (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nature Methods*, *5*(3), 211-212.

Atkinson, C. J., Zhang, K., Munn, A. L., Wiegmans, A., & Wei, M. Q. (2016). Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion*, *10*(1), 63-82.

Ayers, J. I., Paras, N. A., & Prusiner, S. B. (2020). Expanding spectrum of prion diseases. *Emerging Topics in Life Sciences*, *4*(2), 155-167.

Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion disease in dromedary camels, Algeria. *Emerging infectious diseases*, *24*(6), 1029.

Bajsarowicz, K., Ahn, M., Ackerman, L., Dearmond, B. N., Carlson, G., & DeArmond, S. J. (2012). A brain aggregate model gives new insights into the pathobiology and treatment of prion diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *71*(5), 449-466.

Baker, h. f., Duchen, l. w., Jacobs, j. m., & Ridley, r. m. (1990). Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from creutzfeldt-jakob and familial gerstmann-sträussler-scheinker diseases. *brain*, *113*(6), 1891-1909.

Baker, H. F., Ridley, R. M., & Wells, G. A. (1993). Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *The Veterinary Record*, *132*(16), 403-406.

Barmada, S., Piccardo, P., Yamaguchi, K., Ghetti, B., & Harris, D. A. (2004). GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, *16*(3), 527-537.

Baron, G. S., Hughson, A. G., Raymond, G. J., Offerdahl, D. K., Barton, K. A., Raymond, L. D., Dorward, D. W., & Caughey, B. (2011). Effect of glycans and the glycophosphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein : Improved purifications and infrared spectra. *Biochemistry*, *50*(21), 4479-4490.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, *46*(3), 417-428.

Belondrade, M., Nicot, S., Béringue, V., Coste, J., Lehmann, S., & Bougard, D. (2016). Rapid and Highly Sensitive Detection of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Abnormal Prion Protein on Steel Surfaces by Protein Misfolding Cyclic Amplification : Application to Prion Decontamination Studies. *PloS One*, *11*(1), e0146833.

Beringue, V. (2017). *Prion diseases in mammals*.

Béringue, V., Andréoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J.-L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabé, A.-G., & Baron, T. (2007). A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *Journal of Neuroscience*, *27*(26), 6965-6971.

Béringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science (New York, N.Y.)*, *335*(6067), 472-475.

Béringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le Dur, A., Casalone, C., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2008). Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerging infectious diseases*, *14*(12), 1898.

Béringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haïk, S., Vilotte, J.-L., Fontés, M., & Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PloS One*, *3*(1), e1419.

Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(33), 20313-20316.

Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology*, *68*(12), 7859-7868.

Bian, J., Khaychuk, V., Angers, R. C., Fernández-Borges, N., Vidal, E., Meyerett-Reid, C., Kim, S., Calvi, C. L., Bartz, J. C., Hoover, E. A., Agrimi, U., Richt, J. A., Castilla, J., & Telling, G. C. (2017). Prion replication without host adaptation during interspecies transmissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(5), 1141-1146.

Bian, J., Napier, D., Khaychuck, V., Angers, R., Graham, C., & Telling, G. (2010). Cell-based quantification of chronic wasting disease prions. *Journal of Virology*, *84*(16), 8322-8326.

Biljan, I., Ilc, G., Giachin, G., Legname, G., & Plavec, J. (2013). NMR structural studies of human cellular prion proteins. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *13*(19), 2407-2418.

Bishop, M. T., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H. N., Plinston, C., Thomson, V., Tuzi, N. L., Head, M. W., Ironside, J. W., Will, R. G., & Manson, J. C. (2006). Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *The Lancet. Neurology*, *5*(5), 393-398.

Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., & Baskakov, I. V. (2005). In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *Journal of Molecular Biology*, *346*(2), 645-659.

Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V. V., & Baskakov, I. V. (2006). Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(4), 2373-2379.

Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(7), 4046-4051.

Borchelt, D. R., Rogers, M., Stahl, N., Telling, G., & Prusiner, S. B. (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology*, *3*(4), 319-329.

Bosque, P. J., & Prusiner, S. B. (2000). Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *Journal of Virology*, *74*(9), 4377-4386.

Bougard, D., Brandel, J.-P., Bélondrade, M., Béringue, V., Segarra, C., Fleury, H., Laplanche, J.-L., Mayran, C., Nicot, S., Green, A., Welaratne, A., Narbey, D., Fournier-Wirth, C., Knight, R., Will, R., Tiberghien, P., Haïk, S., & Coste, J. (2016). Detection of prions in the plasma of presymptomatic and symptomatic patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Science Translational Medicine*, *8*(370), 370ra182.

Bourkas, M. E. C., Arshad, H., Al-Azzawi, Z. A. M., Halgas, O., Shikiya, R. A., Mehrabian, M., Schmitt-Ulms, G., Bartz, J. C., & Watts, J. C. (2019). Engineering a murine cell line for the stable propagation of hamster prions. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(13), 4911-4923.

Breydo, L., Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2008). Methods for conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *459*, 105-115.

Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., & Kretzschmar, H. A. (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Experimental Neurology*, *146*(1), 104-112.

Brown, K., & Mastrianni, J. A. (2010). The prion diseases. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, *23*(4), 277-298.

Brown, P., Will, R. G., Bradley, R., Asher, D. M., & Detwiler, L. (2001). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease : Background, evolution, and current concerns. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(1), 6-16.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, *389*(6650), 498-501.

Bruce, Moira E. (2003). TSE strain variation. *British Medical Bulletin*, *66*, 99-108.

Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, *73*(7), 1339-1347.

Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, *356*(6370), 577-582.

Buschmann, A., Gretzschel, A., Biacabe, A.-G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C., & Groschup, M. H. (2006). Atypical BSE in Germany—Proof of transmissibility and biochemical characterization. *Veterinary microbiology*, *117*(2-4), 103-116.

Buschmann, A., Pfaff, E., Reifenberg, K., Müller, H. M., & Groschup, M. H. (2000). Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C). *Archives of Virology. Supplementum*, *16*, 75-86.

Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T., & Prusiner, S. B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *Journal of Virology*, *62*(5), 1558-1564.

Cali, I., Castellani, R., Alshekhlee, A., Cohen, Y., Blevins, J., Yuan, J., Langeveld, J. P. M., Parchi, P., Safar, J. G., Zou, W.-Q., & Gambetti, P. (2009). Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease : Its effect on the phenotype and prion-type characteristics. *Brain: A Journal of Neurology*, *132*(Pt 10),

Cancellotti, E., Wiseman, F., Tuzi, N. L., Baybutt, H., Monaghan, P., Aitchison, L., Simpson, J., & Manson, J. C. (2005). Altered glycosylated PrP proteins can have different neuronal trafficking in brain but do not acquire scrapie-like properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(52), 42909-42918.

Carlson, G. A., Ebeling, C., Yang, S. L., Telling, G., Torchia, M., Groth, D., Westaway, D., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1994). Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5690-5694.

Carroll, J. A., Striebel, J. F., Rangel, A., Woods, T., Phillips, K., Peterson, K. E., Race, B., & Chesebro, B. (2016). Prion Strain Differences in Accumulation of PrPSc on Neurons and Glia Are Associated with Similar Expression Profiles of Neuroinflammatory Genes : Comparison of Three Prion Strains. *PLoS Pathogens*, *12*(4), e1005551.

Cassard, H., Torres, J.-M., Lacroux, C., Douet, J.-Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J.-C., Beringue, V., &

Andréoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nature Communications*, *5*(1), 5821.

Castilla, J., Gonzalez-Romero, D., Saá, P., Morales, R., De Castro, J., & Soto, C. (2008). Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*, *134*(5), 757-768.

Castilla, J., Saá, P., & Soto, C. (2005). Detection of prions in blood. *Nature Medicine*, *11*(9), 982-985.

Castille, J., Passet, B., Makhzami, S., Vilotte, M., Moazami-Goudarzi, K., Truchet, S., Daniel-Carlier, N., Gaillard, A.-L., Andréoletti, O., Vaiman, D., Beauvallet, C., Vaiman, A., Floriot, S., Calvel, P., Mouillet-Richard, S., Duchesne, A., Béringue, V., & Vilotte, J.-L. (2021). Co-invalidation of Prnp and Sprn in FVB/N mice affects reproductive performances and highlight complex biological relationship between PrP and Shadoo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *551*, 1-6.

Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of Virology*, *63*(1), 175-181.

Caughey, B., & Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(27), 18217-18223.

Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D., & Race, R. E. (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s) : Implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *Journal of Virology*, *65*(12), 6597-6603.

Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., & Caughey, W. S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, *30*(31), 7672-7680.

Chakroun, N., Prigent, S., Dreiss, C. A., Noinville, S., Chapuis, C., Fraternali, F., & Rezaei, H. (2010). The oligomerization properties of prion protein are restricted to the H2H3 domain. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(9), 3222-3231.

Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet (London, England)*, *1*(7191), 1378-1379.

Chandler, R. L. (1971). Intramammary inoculation of mice with scrapie. *The British Veterinary Journal*, *127*(2), i-ii.

Chandler, R. L., & Fisher, J. (1963). EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF SCRAPIE TO RATS. *Lancet (London, England)*, *2*(7318), 1165.

Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P., & Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(32), 19173-19180.

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., & Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5727), 1435-1439.

Ciric, D., Richard, C.-A., Moudjou, M., Chapuis, J., Sibille, P., Daude, N., Westaway, D., Adrover, M., Béringue, V., Martin, D., & Rezaei, H. (2015). Interaction between Shadoo and PrP Affects the PrP-Folding Pathway. *Journal of Virology*, *89*(12), 6287-6293.

Clarke, M. C., & Haig, D. A. (1970). Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture. *Nature*, *225*(5227), 100-101.

Clarke, M. C., & Millson, G. C. (1976). Infection of a cell line of mouse L fibroblasts with scrapie agent. *Nature*, *261*(5556), 144-145.

Cobb, N. J., Sönnichsen, F. D., Mchaourab, H., & Surewicz, W. K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid : A parallel, in-register β-structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(48), 18946-18951.

Cobb, N. J., & Surewicz, W. K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry*, *48*(12), 2574-2585.

Colby, D. W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I. V., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2009). Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20417-20422.

Colby, D. W., Wain, R., Baskakov, I. V., Legname, G., Palmer, C. G., Nguyen, H.-O. B., Lemus, A., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2010). Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000736.

Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Gowland, I., Medori, R., Ironside, J., & Lantos, P. (1995). Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet (London, England)*, *346*(8974), 569-570.

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690.

Collinge, John, & Clarke, A. R. (2007). A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936.

Collinge, John, Whitfield, J., McKintosh, E., Frosh, A., Mead, S., Hill, A. F., Brandner, S., Thomas, D., & Alpers, M. P. (2008). A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1510), 3725-3739.

Colucci, M., Moleres, F. J., Xie, Z.-L., Ray-Chaudhury, A., Gutti, S., Butefisch, C. M., Cervenakova, L., Wang, W., Goldfarb, L. G., Kong, Q., Ghetti, B., Chen, S. G., & Gambetti, P. (2006). Gerstmann-Sträussler-Scheinker : A new phenotype with « curly » PrP deposits. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *65*(7), 642-651.

Comoy, E. E., Casalone, C., Lescoutra-Etchegaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marcé, D., Auvré, F., Ruchoux, M.-M., Ferrari, S., & Monaco, S. (2008). Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PloS one*, *3*(8), e3017.

Corda, E., Du, X., Shim, S. Y., Klein, A. N., Siltberg-Liberles, J., & Gilch, S. (2018). Interaction of Peptide Aptamers with Prion Protein Central Domain Promotes α-Cleavage of PrPC. *Molecular Neurobiology*, *55*(10), 7758-7774.

Cortelli, P., Gambetti, P., Montagna, P., & Lugaresi, E. (1999). Fatal familial insomnia : Clinical features and molecular genetics. *Journal of sleep research*, *8*, 23-29.

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., & Vilette, D. (2008). A cell line infectible by prion strains from different species. *The Journal of General Virology*, *89*(Pt 1), 341-347.

Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., & Begueret, J. (1997). The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(18), 9773-9778.

Cronier, P., Talha, A., & Massin, P. (2004). Central talar fractures—Therapeutic considerations. *Injury*, *35 Suppl 2*, SB10-22.

Cronier, S., Beringue, V., Bellon, A., Peyrin, J.-M., & Laude, H. (2007). Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures. *Journal of Virology*, *81*(24), 13794-13800.

Cronier, S., Carimalo, J., Schaeffer, B., Jaumain, E., Béringue, V., Miquel, M.-C., Laude, H., & 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*(9), 3854-3861.

Cronier, S., Laude, H., & Peyrin, J.-M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(33), 12271-12276.

Daskalov, A., Martinez, D., Coustou, V., El Mammeri, N., Berbon, M., Andreas, L. B., Bardiaux, B., Stanek, J., Noubhani, A., Kauffmann, B., Wall, J. S., Pintacuda, G., Saupe, S. J., Habenstein, B., & Loquet, A. (2021). Structural and molecular basis of cross-seeding barriers in amyloids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(1).

Daude, N., Wohlgemuth, S., Brown, R., Pitstick, R., Gapeshina, H., Yang, J., Carlson, G. A., & Westaway, D. (2012). Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(23), 9035-9040.

DebBurman, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B., & Lindquist, S. (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 13938-13943.

Deslys Jean-Philippe. (2001). *La vache folle : Les risques pour l'homme / Jean-Philippe Deslys, André Picot*. Flammarion.

Dexter, G., Tongue, S. C., Heasman, L., Bellworthy, S. J., Davis, A., Moore, S. J., Simmons, M. M., Sayers, A. R., Simmons, H. A., & Matthews, D. (2009). The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock. *BMC Veterinary Research*, *5*, 38.

Di Fede, G., Catania, M., Atzori, C., Moda, F., Pasquali, C., Indaco, A., Grisoli, M., Zuffi, M., Guaita, M. C., Testi, R., Taraglio, S., Sessa, M., Gusmaroli, G., Spinelli, M., Salzano, G., Legname, G., Tarletti, R., Godi, L., Pocchiari, M., … Giaccone, G. (2019). Clinical and neuropathological phenotype associated with the novel V189I mutation in the prion protein gene. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 1.

Dickinson, A. G., Meikle, V. M., & Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology*, *78*(3), 293-299.

Dickinson, A. G., Stamp, J. T., Renwick, C. C., & Rennie, J. C. (1968). Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. *Journal of Comparative Pathology*, *78*(3), 313-321.

Dinkel, K. D., Schneider, D. A., Muñoz-Gutiérrez, J. F., McElliott, V. R., & Stanton, J. B. (2017). Correlation of cellular factors and differential scrapie prion permissiveness in ovine microglia. *Virus Research*, *240*, 69-80.

Dong, T.-T.-T., & Satoh, K. (2021). The Latest Research on RT-QuIC Assays-A Literature Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(3).

Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231) : The N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 13452-13457.

Edgeworth, J. A., Farmer, M., Sicilia, A., Tavares, P., Beck, J., Campbell, T., Lowe, J., Mead, S., Rudge, P., Collinge, J., & Jackson, G. S. (2011). Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease : A blood-based assay. *Lancet (London, England)*, *377*(9764), 487-493.

Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, B., Tréguer, E., Rezaei, H., & Knossow, M. (2004). Insight into the PrPC-->PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(28), 10254-10259.

Elsen, J.-M., Mangin, B., Goffinet, B., Boichard, D., & Le Roy, P. (1999). Alternative models for QTL detection in livestock. I. General introduction. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, *31*(3), 213-224.

Eraña, H., Charco, J. M., Di Bari, M. A., Díaz-Domínguez, C. M., López-Moreno, R., Vidal, E., González-Miranda, E., Pérez-Castro, M. A., García-Martínez, S., Bravo, S., Fernández-Borges, N., Geijo, M., D'Agostino, C., Garrido, J., Bian, J., König, A., Uluca-Yazgi, B., Sabate, R., Khaychuk, V., … Castilla, J. (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*(10), e1008117.

Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., Codogno, P., Kellermann, O., & Botti, J. (2003). Evolving views in prion glycosylation : Functional and pathological implications. *Biochimie*, *85*(1-2), 33-45.

Ertmer, A., Gilch, S., Yun, S.-W., Flechsig, E., Klebl, B., Stein-Gerlach, M., Klein, M. A., & Schätzl, H. M. (2004). The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(40), 41918-41927.

Falsig, J., Julius, C., Margalith, I., Schwarz, P., Heppner, F. L., & Aguzzi, A. (2008). A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nature Neuroscience*, *11*(1), 109-117.

Falsig, J., Sonati, T., Herrmann, U. S., Saban, D., Li, B., Arroyo, K., Ballmer, B., Liberski, P. P., & Aguzzi, A. (2012). Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures. *PLoS Pathogens*, *8*(11), e1002985.

Fändrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *64*(16), 2066-2078.

Finckh, U., Müller-Thomsen, T., Mann, U., Eggers, C., Marksteiner, J., Meins, W., Binetti, G., Alberici, A., Sonderegger, P., Hock, C., Nitsch, R. M., & Gal, A. (2000). High frequency of mutations in four different disease genes in early-onset dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *920*, 100-106.

Fiorini, M., Bongianni, M., Monaco, S., & Zanusso, G. (2017). Biochemical Characterization of Prions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *150*, 389-407.

Fischer, M., Rülicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *The EMBO Journal*, *15*(6), 1255-1264.

Fivaz, M., Vilbois, F., Thurnheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P. E., Parton, R. G., & van der Goot, F. G. (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *The EMBO Journal*, *21*(15), 3989-4000.

Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (2000). Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron*, *27*(2), 399-408.

Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J.-P., Decavel, J.-P., Varea, R., Grassi, J., Fontès, M., & Cesbron, J.-Y. (2002). PrP expression and replication by Schwann cells : Implications in prion spreading. *Journal of Virology*, *76*(5), 2434-2439.

Friedman-Levi, Y., Meiner, Z., Canello, T., Frid, K., Kovacs, G. G., Budka, H., Avrahami, D., & Gabizon, R. (2011). Fatal prion disease in a mouse model of genetic E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathogens*, *7*(11), e1002350.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., & Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, *209*(5025), 794-796.

Gajdusek, Daniel Carleton, & Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea : The endemic occurrence of kuru in the native population. *New England Journal of Medicine*, *257*(20), 974-978.

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD : Classification and characterisation. *British medical bulletin*, *66*(1), 213-239.

Giachin, G., Mai, P. T., Tran, T. H., Salzano, G., Benetti, F., Migliorati, V., Arcovito, A., Della Longa, S., Mancini, G., D'Angelo, P., & Legname, G. (2015). The non-octarepeat copper binding site of the prion protein is a key regulator of prion conversion. *Scientific Reports*, *5*, 15253.

Gibbs, C. J., Asher, D. M., Kobrine, A., Amyx, H. L., Sulima, M. P., & Gajdusek, D. C. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *57*(6), 757-758.

Giri, R. K., Young, R., Pitstick, R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Carlson, G. A. (2006). Prion infection of mouse neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3875-3880.

Glatzel, M., Giger, O., Seeger, H., & Aguzzi, A. (2004). Variant Creutzfeldt–Jakob disease : Between lymphoid organs and brain. *Trends in Microbiology*, *12*(2), 51-53.

Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Lührs, T., & Aguzzi, A. (2005). Human prion diseases : Molecular and clinical aspects. *Archives of neurology*, *62*(4), 545-552.

Glynn, C., Sawaya, M. R., Ge, P., Gallagher-Jones, M., Short, C. W., Bowman, R., Apostol, M., Zhou, Z. H., Eisenberg, D. S., & Rodriguez, J. A. (2020). Cryo-EM structure of a human prion fibril with a hydrophobic, protease-resistant core. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*(5), 417-423.

Gong, B., Ramos, A., Vázquez-Fernández, E., Silva, C. J., Alonso, J., Liu, Z., & Requena, J. R. (2011). Probing structural differences between PrP(C) and PrP(Sc) by surface nitration and acetylation : Evidence of conformational change in the C-terminus. *Biochemistry*, *50*(22), 4963-4972.

Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed β-helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(22), 8342-8347.

Griffith, J. S. (1967). Nature of the Scrapie Agent : Self-replication and Scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044.

Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel In-register Intermolecular β-Sheet Architectures for Prion-seeded Prion Protein (PrP) Amyloids*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(35), 24129-24142.

Groveman, B. R., Ferreira, N. C., Foliaki, S. T., Walters, R. O., Winkler, C. W., Race, B., Hughson, A. G., Zanusso, G., & Haigh, C. L. (2021). Human cerebral organoids as a therapeutic drug screening model for Creutzfeldt-Jakob disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 5165.

Guillot-Sestier, M.-V., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., & Checler, F. (2009). The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(51), 35973-35986.

Guillot-Sestier, M.-V., Sunyach, C., Ferreira, S. T., Marzolo, M.-P., Bauer, C., Thevenet, A., & Checler, F. (2012). α-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid β (Aβ)-associated cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(7), 5021-5032.

Hadlow, W. J. (1959). SCRAPIE AND KURU. *The Lancet*, *274*(7097), 289-290.

Hadži, S., Ondračka, A., Jerala, R., & Hafner-Bratkovič, I. (2015). Pathological mutations H187R and E196K facilitate subdomain separation and prion protein conversion by destabilization of the native structure. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *29*(3), 882-893.

Hafner-Bratkovic, I., Bester, R., Pristovsek, P., Gaedtke, L., Veranic, P., Gaspersic, J., Mancek-Keber, M., Avbelj, M., Polymenidou, M., Julius, C., Aguzzi, A., Vorberg, I., & Jerala, R. (2011). Globular domain of the prion protein needs to be unlocked by domain swapping to support prion protein conversion. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(14), 12149-12156.

Halliday, M., & Mallucci, G. R. (2014). Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration : A new approach to therapy. *Neuropharmacology*, *76 Pt A*, 169-174.

Halliez, S., Reine, F., Herzog, L., Jaumain, E., Haïk, S., Rezaei, H., Vilotte, J.-L., Laude, H., & Béringue, V. (2014). Accelerated, spleen-based titration of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in transgenic mice expressing human prion protein with sensitivity comparable to that of survival time bioassay. *Journal of Virology*, *88*(15), 8678-8686.

Hannaoui, S., Maatouk, L., Privat, N., Levavasseur, E., Faucheux, B. A., & Haïk, S. (2013). Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type. *Journal of Virology*, *87*(5), 2535-2548.

Harman, J. L., & Silva, C. J. (2009). Bovine spongiform encephalopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *234*(1), 59-72.

Harris, R. K., Becker, E. D., Cabral De Menezes, S. M., Granger, P., Hoffman, R. E., Zilm, K. W., & International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division. (2008). Further conventions for NMR shielding and chemical shifts IUPAC recommendations 2008. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, *33*(3), 41-56.

Hauw, J. J., Haik, S., & Brandel, J. P. (2015). History of Prions and transmission of protein misfolding. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, *199*(6), 787-796

Heinrich, S. U., & Lindquist, S. (2011). Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal Aplysia cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(7), 2999-3004.

Heiseke, A., Aguib, Y., Riemer, C., Baier, M., & Schätzl, H. M. (2009). Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *Journal of Neurochemistry*, *109*(1), 25-34.

Helmus, J. J., Surewicz, K., Nadaud, P. S., Surewicz, W. K., & Jaroniec, C. P. (2008). Molecular conformation and dynamics of the Y145Stop variant of human prion protein in amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(17), 6284-6289.

Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., & Soto, C. (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5435-5445.

Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J., & Caughey, B. (2000). Interactions between heterologous forms of prion protein : Binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(11), 5836-5841.

Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *The Journal of General Virology*, *76 (Pt 10)*, 2583-2587.

Hornemann, S., Schorn, C., & Wüthrich, K. (2004). NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Reports*, *5*(12), 1159-1164.

Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Cass, C., Da Costa, M., Conneally, P. M., Hodes, M. E., Ghetti, B., & Prusiner, S. B. (1992). Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics*, *1*(1), 68-71.

Hsiao, K. K., Scott, M., Foster, D., Groth, D. F., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science (New York, N.Y.)*, *250*(4987), 1587-1590.

Hsiao, Karen, Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J., & Prusiner, S. B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann–Sträussler syndrome. *Nature*, *338*(6213), 342-345.

Huang, Z., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (1996). Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *207*, 49-67.

Huin, C., Cronier, S., Guégan, P., Béringue, V., Rezaei, H., & 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.

Igel-Egalon, A., Béringue, V., Rezaei, H., & Sibille, P. (2018). Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *7*(1).

Ilc, G., Giachin, G., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Benetti, F., Plavec, J., Zhukov, I., & Legname, G. (2010). NMR structure of the human prion protein with the pathological Q212P mutation reveals unique structural features. *PloS One*, *5*(7), e11715.

Ironside, J. W. (2010). Variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Haemophilia*, *16*(s5), 175-180.

Iwamaru, Y., Takenouchi, T., Ogihara, K., Hoshino, M., Takata, M., Imamura, M., Tagawa, Y., Hayashi-Kato, H., Ushiki-Kaku, Y., Shimizu, Y., Okada, H., Shinagawa, M., Kitani, H., & Yokoyama, T. (2007). Microglial cell line established from prion protein-overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains. *Journal of Virology*, *81*(3), 1524-1527.

Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L., Gibbs, N., Waltho, J. P., Clarke, A. R., & Collinge, J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8531-8535.

Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Faas, H., Steele, A. D., King, O. D., Watson, N., Jasanoff, A., & Lindquist, S. (2009). Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron*, *63*(4), 438-450.

Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Watson, N. E., King, O. D., Faas, H., Jasanoff, A., & Lindquist, S. (2013). Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(36), 14759-14764.

Jarosz-Griffiths, H. H., Corbett, N. J., Rowland, H. A., Fisher, K., Jones, A. C., Baron, J., Howell, G. J., Cowley, S. A., Chintawar, S., Cader, M. Z., Kellett, K. A. B., & Hooper, N. M. (2019). Proteolytic shedding of the prion protein via activation of metallopeptidase ADAM10 reduces cellular binding and toxicity of amyloid-β oligomers. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(17), 7085-7097.

Jarrett, J. T., & Lansbury, P. T. (1993). Seeding « one-dimensional crystallization » of amyloid : A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, *73*(6), 1055-1058.

Jiayu, W., Zhu, H., Ming, X., Xiong, W., Songbo, W., Bocui, S., Wensen, L., Jiping, L., Keying, M., Zhongyi, L., & Hongwei, G. (2010). Mapping the interaction site of prion protein and Sho. *Molecular Biology Reports*, *37*(5), 2295-2300.

Kim, C., Xiao, X., Chen, S., Haldiman, T., Smirnovas, V., Kofskey, D., Warren, M., Surewicz, K., Maurer, N. R., Kong, Q., Surewicz, W., & Safar, J. G. (2018). Artificial strain of human prions created in vitro. *Nature Communications*, *9*(1), 2166.

Kim, T.-Y., Shon, H.-J., Joo, Y.-S., Mun, U.-K., Kang, K.-S., & Lee, Y.-S. (2005). Additional cases of chronic wasting disease in imported deer in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*, *67*(8), 753-759.

Kimberlin, R. H., & Walker, C. (1977). Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *The Journal of General Virology*, *34*(2), 295-304.

Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *The Journal of General Virology*, *39*(3), 487-496.

Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1979). Pathogenesis of mouse scrapie : Dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *Journal of Comparative Pathology*, *89*(4), 551-562. h

Klein, T. R., Kirsch, D., Kaufmann, R., & Riesner, D. (1998). Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biological Chemistry*, *379*(6), 655-666.

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, *370*(6489), 471-474.

Kotta, K., Paspaltsis, I., Bostantjopoulou, S., Latsoudis, H., Plaitakis, A., Kazis, D., Collinge, J., & Sklaviadis, T. (2006). Novel mutation of the PRNP gene of a clinical CJD case. *BMC Infectious Diseases*, *6*, 169.

Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Hughson, A. G., Artikis, E., Race, B., & Caughey, B. (2021). Structure of an infectious mammalian prion. *BioRxiv*, 2021.02.14.431014.

Kraus, A., Raymond, G. J., Race, B., Campbell, K. J., Hughson, A. G., Anson, K. J., Raymond, L. D., & Caughey, B. (2017). PrP P102L and Nearby Lysine Mutations Promote Spontaneous In Vitro Formation of Transmissible Prions. *Journal of Virology*, *91*(21).

Krejciova, Z., Alibhai, J., Zhao, C., Krencik, R., Rzechorzek, N. M., Ullian, E. M., Manson, J., Ironside, J. W., Head, M. W., & Chandran, S. (2017). Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(12), 3481-3495.

Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., Wadsworth, J. D. F., Collinge, J., & Tabrizi, S. J. (2005). Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38851-38861.

Kunes, K. C., Clark, S. C., Cox, D. L., & Singh, R. R. P. (2008). Left handed beta helix models for mammalian prion fibrils. *Prion*, *2*(2), 81-90.

Kushwaha, R., Sinha, A., Makarava, N., Molesworth, K., & Baskakov, I. V. (2021). Non-cell autonomous astrocyte-mediated neuronal toxicity in prion diseases. *Acta Neuropathologica Communications*, *9*(1), 22.

Kuwahara, C., Takeuchi, A. M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S., & Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, *400*(6741), 225-226.

Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbière, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J.-L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., & Andréoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathogens*, *4*(12), e1000238.

Ladogana, A., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Jarius, C., Collins, S., Klug, G. M., Sutcliffe, T., Giulivi, A., & Alperovitch, A. (2005). Mortality from Creutzfeldt–Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, *64*(9), 1586-1591.

Langeveld, J. P. M., Jacobs, J. G., Erkens, J. H. F., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., & van Keulen, L. J. M. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Veterinary Research*, *2*, 19.

Langevin, C., Andréoletti, O., Le Dur, A., Laude, H., & Béringue, V. (2011). Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, *41*(1), 219-225.

Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1995). The chemistry of scrapie infection : Implications of the « ice 9 » metaphor. *Chemistry & Biology*, *2*(1), 1-5.

Lasmézas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Hauw, J. J., & Dormont, D. (1996). Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *The Journal of General Virology*, *77 (Pt 7)*, 1601-1609.

Lasmézas, Corinne Ida, Comoy, E., Hawkins, S., Herzog, C., Mouthon, F., Konold, T., Auvré, F., Correia, E., Lescoutra-Etchegaray, N., Salès, N., Wells, G., Brown, P., & Deslys, J.-P. (2005). Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet (London, England)*, *365*(9461), 781-783.

Lawson, V. A., Collins, S. J., Masters, C. L., & Hill, A. F. (2005). Prion protein glycosylation. *Journal of Neurochemistry*, *93*(4), 793-801.

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., & Hill, A. F. (2008). Mouse-adapted sporadic human Creutzfeldt-Jakob disease prions propagate in cell culture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(12), 2793-2801.

Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Laï, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J.-L., Sarradin, P., Benestad, S. L., & Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(44), 16031-16036.

Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A. F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S. B., & Hood, L. E. (1998). Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Research*, *8*(10), 1022-1037.

Lee, J., & Chang, I. (2019). Structural insight into conformational change in prion protein by breakage of electrostatic network around H187 due to its protonation. *Scientific Reports*, *9*(1), 19305.

Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(6), 2168-2173.

Levavasseur, E., Privat, N., & Haïk, S. (2019). In vitro Modeling of Prion Strain Tropism. *Viruses*, *11*(3).

Lewis, V., Hill, A. F., Haigh, C. L., Klug, G. M., Masters, C. L., Lawson, V. A., & Collins, S. J. (2009). Increased proportions of C1 truncated prion protein protect against cellular M1000 prion infection. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *68*(10), 1125-1135.

Lewis, V., Johanssen, V. A., Crouch, P. J., Klug, G. M., Hooper, N. M., & Collins, S. J. (2016). Prion protein « gamma-cleavage » : Characterizing a novel endoproteolytic processing event. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *73*(3), 667-683.

Li, A., & Harris, D. A. (2005). Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(17), 17430-17434. h

Liberski, Pawe\l P. (2012). Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Neurodegenerative Diseases*, 128-137.

Liberski, Paweł P., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (2002). How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) : Neuronal autophagy revisited. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *62*(3), 141-147.

Liberski, Pawel P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited : From apoptosis to autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(12), 2473-2490.

Lidón, L., Ferrer, I., & Del Río, J. A. (2020). The Quest for Cellular Prion Protein Functions in the Aged and Neurodegenerating Brain. *Cells*, *9*(3).

Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Brentani, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiological Reviews*, *88*(2), 673-728.

Lombardi, G., Casalone, C., d'Angelo, A., Gelmetti, D., Torcoli, G., Barbieri, I., Corona, C., Fasoli, E., Farinazzo, A., & Fiorini, M. (2008). Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog*, *4*(5), e1000075.

Lu, X., Wintrode, P. L., & Surewicz, W. K. (2007). β-Sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(5), 1510-1515.

Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolai, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Güntert, P., & Wüthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 640-645.

Maddelein, M.-L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Coulary-Salin, B., & Saupe, S. J. (2002). Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7402-7407.

Magalhães, A. C., Baron, G. S., Lee, K. S., Steele-Mortimer, O., Dorward, D., Prado, M. A. M., & Caughey, B. (2005). Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(21), 5207-5216.

Mahal, S. P., Baker, C. A., Demczyk, C. A., Smith, E. W., Julius, C., & Weissmann, C. (2007). Prion strain discrimination in cell culture : The cell panel assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(52), 20908-20913.

Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2008). The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(23), 15988-15996.

Makrinou, E., Collinge, J., & Antoniou, M. (2002). Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, *13*(12), 696-703.

Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., & Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5646), 871-874.

Mallucci, G. R., Ratté, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. R., & Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO Journal*, *21*(3), 202-210.

Mallucci, Giovanna R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., Brandner, S., Jefferys, J. G. R., & Collinge, J. (2007). Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, *53*(3), 325-335.

Mangé, A., Béranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., & Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the Cell*, *96*(2), 125-132.

Manson, J. C., Hope, J., Clarke, A. R., Johnston, A., Black, C., & MacLeod, N. (1995). PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration*, *4*(1),

Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., & Hope, J. (1992). The prion protein gene : A role in mouse embryogenesis? *Development (Cambridge, England)*, *115*(1), 117-122.

Massiot, D., Fayon, F., Alonso, B., Trebosc, J., & Amoureux, J.-P. (2003). Chemical bonding differences evidenced from J-coupling in solid state NMR experiments involving quadrupolar nuclei. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)*, *164*(1), 160-164.

Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., & Seelig, D. M. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *science*, *314*(5796), 133-136.

Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Gizzi, C., Mascellino, M. T., Dolo, V., Pontieri, G. M., Sorice, M., & Pavan, A. (2002). Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochemical Research*, *27*(7-8), 743-749.

Mays, C. E., Coomaraswamy, J., Watts, J. C., Yang, J., Ko, K. W. S., Strome, B., Mercer, R. C. C., Wohlgemuth, S. L., Schmitt-Ulms, G., & Westaway, D. (2014). Endoproteolytic processing of the mammalian prion glycoprotein family. *The FEBS Journal*, *281*(3),

Mead, S., Lloyd, S., & Collinge, J. (2019). Genetic Factors in Mammalian Prion Diseases. *Annual Review of Genetics*, *53*, 117-147.

Mead, S., Stumpf, M. P. H., Whitfield, J., Beck, J. A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J. B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E. M. C., & Collinge, J. (2003). Balancing Selection at the Prion Protein Gene Consistent with Prehistoric Kurulike Epidemics. *Science*, *300*(5619), 640-643.

Mead, S., Whitfield, J., Poulter, M., Shah, P., Uphill, J., Campbell, T., Al-Dujaily, H., Hummerich, H., Beck, J., Mein, C. A., Verzilli, C., Whittaker, J., Alpers, M. P., & Collinge, J. (2009). A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure. *New England Journal of Medicine*, *361*(21), 2056-2065.

Mercer, R. C. C., Daude, N., Dorosh, L., Fu, Z.-L., Mays, C. E., Gapeshina, H., Wohlgemuth, S. L., Acevedo-Morantes, C. Y., Yang, J., Cashman, N. R., Coulthart, M. B., Pearson, D. M., Joseph, J. T., Wille, H., Safar, J. G., Jansen, G. H., Stepanova, M., Sykes, B. D., & Westaway, D. (2018). A novel Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease mutation defines a precursor for amyloidogenic 8 kDa PrP fragments and reveals N-terminal structural changes shared by other GSS alleles. *PLoS Pathogens*, *14*(1), e1006826.

Moda, F., Le, T.-N. T., Aulić, S., Bistaffa, E., Campagnani, I., Virgilio, T., Indaco, A., Palamara, L., Andréoletti, O., Tagliavini, F., & Legname, G. (2015). Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathogens*, *11*(12), e1005354.

Mok, T. H., Nihat, A., Luk, C., Sequeira, D., Batchelor, M., Mead, S., Collinge, J., & Jackson, G. S. (2021). Bank vole prion protein extends the use of RT-QuIC assays to detect prions in a range of inherited prion diseases. *Scientific Reports*, *11*(1), 5231.

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., & Mallucci, G. R. (2013). Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Science Translational Medicine*, *5*(206), 206ra138.

Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andréoletti, O., Rezaei, H., Dron, M., & Béringue, V. (2016). Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. *Scientific Reports*, *6*, 29116.

Moudjou, M., Treguer, E., Rezaei, H., Sabuncu, E., Neuendorf, E., Groschup, M. H., Grosclaude, J., Laude, H., & Neuendorf, E. (2004). Glycan-controlled epitopes of prion protein include a major determinant of susceptibility to sheep scrapie. *Journal of Virology*, *78*(17), 9270-9276.

Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M., & Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5486), 1925-1928.

Mouillet-Richard, Sophie, Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J. G., Mutel, V., Launay, J.-M., & Kellermann, O. (2007). Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1096*, 106-119.

Mould, D. L., Dawson, A. M., & Rennie, J. C. (1970). Very early replication of scrapie in lymphocytic tissue. *Nature*, *228*(5273), 779-780.

Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T., & Benestad, S. L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *The Journal of General Virology*, *86*(Pt 1), 231-235.

Müller, H., Brener, O., Andreoletti, O., Piechatzek, T., Willbold, D., Legname, G., & Heise, H. (2014). Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion*, *8*(5), 344-358.

Müller, W. E., Ushijima, H., Schröder, H. C., Forrest, J. M., Schatton, W. F., Rytik, P. G., & Heffner-Lauc, M. (1993). Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *European Journal of Pharmacology*, *246*(3), 261-267.

Munoz-Montesino, C., Larkem, D., Barbereau, C., Igel-Egalon, A., Truchet, S., Jacquet, E., Nhiri, N., Moudjou, M., Sizun, C., Rezaei, H., Béringue, V., & Dron, M. (2020). A seven-residue deletion in PrP leads to generation of a spontaneous prion formed from C-terminal C1 fragment of PrP. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(41), 14025-14039.

Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Chapuis, J., Ciric, D., Igel-Egalon, A., Laude, H., Béringue, V., Rezaei, H., & Dron, M. (2016). Generating Bona Fide Mammalian Prions with Internal Deletions. *Journal of Virology*, *90*(15), 6963-6975.

Munoz-Montesino, C., Sizun, C., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., Igel-Egalon, A., Barbereau, C., Chapuis, J., Ciric, D., Laude, H., Béringue, V., Rezaei, H., & Dron, M. (2017). A stretch of residues within the protease-resistant core is not necessary for prion structure and infectivity. *Prion*, *11*(1), 25-30.

Nazor, K. E., Kuhn, F., Seward, T., Green, M., Zwald, D., Pürro, M., Schmid, J., Biffiger, K., Power, A. M., Oesch, B., Raeber, A. J., & Telling, G. C. (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *The EMBO Journal*, *24*(13), 2472-2480.

Nishida, N., Harris, D. A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavet, O., & 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*(1), 320-325.

Nuvolone, M., Hermann, M., Sorce, S., Russo, G., Tiberi, C., Schwarz, P., Minikel, E., Sanoudou, D., Pelczar, P., & Aguzzi, A. (2016). Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp-/- mice : A rigorous resource for prion science. *The Journal of Experimental Medicine*, *213*(3), 313-327.

Oesch, B., Westaway, D., & Prusiner, S. B. (1991). Prion protein genes : Evolutionary and functional aspects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *172*, 109-124.

Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature*, *352*(6333), 340-342.

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., & Cohen, F. E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 10962-10966.

Pantera, B., Bini, C., Cirri, P., Paoli, P., Camici, G., Manao, G., & Caselli, A. (2009). PrPc activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells : Role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. *Journal of Neurochemistry*, *110*(1), 194-207.

Paquet, S., Langevin, C., Chapuis, J., Jackson, G. S., Laude, H., & Vilette, D. (2007). Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *The Journal of General Virology*, *88*(Pt 2), 706-713.

Pattison, I. H., & Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, *71*, 101-109.

Peoc'h, K., Levavasseur, E., Delmont, E., De Simone, A., Laffont-Proust, I., Privat, N., Chebaro, Y., Chapuis, C., Bedoucha, P., & Brandel, J.-P. (2012). Substitutions at residue 211 in the prion protein drive a switch between CJD and GSS syndrome, a new mechanism governing inherited neurodegenerative disorders. *Human molecular genetics*, *21*(26), 5417-5428.

Pimenta, J., Domingos, A., Santos, P., Marques, C. C., Cantante, C., Santos, A., Barbas, J. P., Baptista, M. C., Horta, A. E. M., Viegas, A., Mesquita, P., Gonçalves, J., Fontes, C. A., Prates, J. A. M., & Pereira, R. M. L. N. (2012). Is prnt a pseudogene? Identification of ram Prt in testis and ejaculated spermatozoa. *PloS One*, *7*(8), e42957.

Pradines, E., Loubet, D., Schneider, B., Launay, J.-M., Kellermann, O., & Mouillet-Richard, S. (2008). CREB-dependent gene regulation by prion protein : Impact on MMP-9 and beta-dystroglycan. *Cellular Signalling*, *20*(11), 2050-2058.

Prions : Health scare and biological challenge | Nature Reviews Molecular Cell Biology. (s. d.). Consulté 4 mai 2021, à l'adresse https://www.nature.com/articles/35052063

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, *216*(4542), 136-144.

Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., Masiarz, F. R., McKinley, M. P., & Martinez, H. M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, *19*(21), 4883-4891.

Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., & Carlson, G. A. (1990). Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, *63*(4), 673-686.

Prusiner, Stanley B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, *278*(5336), 245-251.

Prusiner, Stanley B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*, *47*, 601-623.

Qi, Y., Wang, J. K., McMillian, M., & Chikaraishi, D. M. (1997). Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(4), 1217-1225.

Race, B., Meade-White, K. D., Phillips, K., Striebel, J., Race, R., & Chesebro, B. (2014). Chronic wasting disease agents in nonhuman primates. *Emerging infectious diseases*, *20*(5), 833.

Race, R. E., Fadness, L. H., & Chesebro, B. (1987). Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of General Virology*, *68 (Pt 5)*, 1391-1399.

Requena, J. R., & Wille, H. (2017). The Structure of the Infectious Prion Protein and Its Propagation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *150*, 341-359.

Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T., & Grosclaude, J. (2005). Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *Journal of Molecular Biology*, *347*(3), 665-679.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, *382*(6587), 180-182.

Robakis, N. K., Devine-Gage, E. A., Jenkins, E. C., Kascsak, R. J., Brown, W. T., Krawczun, M. S., & Silverman, W. P. (1986). Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *140*(2), 758-765.

Rubenstein, R., Carp, R. I., & Callahan, S. M. (1984). In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model : Infection of PC12 cells. *The Journal of General Virology*, *65 (Pt 12)*, 2191-2198.

Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B., & Dwek, R. A. (2001). Prion glycoprotein : Structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry*, *40*(13), 3759-3766.

Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813.

Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C., & Gibbs, C. J. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20276-20284.

Salamat, Muhammad K., Dron, M., Chapuis, J., Langevin, C., & Laude, H. (2011). Prion propagation in cells expressing PrP glycosylation mutants. *Journal of Virology*, *85*(7), 3077-3085.

Salamat, Muhammad Khalid, Munoz-Montesino, C., Moudjou, M., Rezaei, H., Laude, H., Béringue, V., & Dron, M. (2013). Mammalian prions : Tolerance to sequence changes-how far? *Prion*, *7*(2), 131-135.

Santos, T. G., Silva, I. R., Costa-Silva, B., Lepique, A. P., Martins, V. R., & Lopes, M. H. (2011). Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *29*(7), 1126-1136.

Sarradin, P., Viglietta, C., Limouzin, C., Andréoletti, O., Daniel-Carlier, N., Barc, C., Leroux-Coyau, M., Berthon, P., Chapuis, J., Rossignol, C., Gatti, J.-L., Belghazi, M., Labas, V., Vilotte, J.-L., Béringue, V., Lantier, F., Laude, H., & Houdebine, L.-M. (2015). Transgenic Rabbits Expressing Ovine PrP Are Susceptible to Scrapie. *PLoS Pathogens*, *11*(8), e1005077.

Schätzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., Mobley, W. C., & Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *Journal of Virology*, *71*(11), 8821-8831.

Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M., Ermonval, M., Mouillet-Richard, S., & Kellermann, O. (2003). NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(23), 13326-13331.

Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14279-14284.

Serra, F., Dudas, S., Torres, J. M., Anderson, R., Oevermann, A., Espinosa, J. C., Czub, S., & Seuberlich, T. (2018). Presumptive BSE cases with an aberrant prion protein phenotype in Switzerland, 2011 : Lack of prion disease in experimentally inoculated cattle and bovine prion protein transgenic mice. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(5), 1348-1356.

Seuberlich, T., Gsponer, M., Drögemüller, C., Polak, M. P., McCutcheon, S., Heim, D., Oevermann, A., & Zurbriggen, A. (2012). Novel prion protein in BSE-affected cattle, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(1), 158-159.

Shyng, S. L., Heuser, J. E., & Harris, D. A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *The Journal of Cell Biology*, *125*(6), 1239-1250.

Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., Chiang, M.-F., Ding, D.-C., Li, K.-W., Chen, S.-F., Yang, H.-I., & Li, H. (2005). Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(39), 8967-8977.

Si, K., Choi, Y.-B., White-Grindley, E., Majumdar, A., & Kandel, E. R. (2010). Aplysia CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell*, *140*(3), 421-435.

Sikorska, B., Knight, R., Ironside, J. W., & Liberski, P. P. (2012). Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegenerative Diseases*, 76-90.

Silva, C. J., Vázquez-Fernández, E., Onisko, B., & Requena, J. R. (2015). Proteinase K and the structure of PrPSc : The good, the bad and the ugly. *Virus Research*, *207*, 120-126.

Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., & Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature*, *437*(7056), 257-261.

Sim, V. L., & Caughey, B. (2009). Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiology of Aging*, *30*(12), 2031-2042.

Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.-G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schätzl, H., & Lasmézas, C. I. (2007). In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathogens*, *3*(8), e125.

Solassol, J., Crozet, C., & Lehmann, S. (2003). Prion propagation in cultured cells. *British Medical Bulletin*, *66*, 87-97.

Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., Biasini, E., & Requena, J. R. (2019). Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLOS Pathogens*, *15*(7), e1007864.

Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., & Mohandas, T. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(19), 7358-7362.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, *51*(2), 229-240.

Stöhr, J., Watts, J. C., Legname, G., Oehler, A., Lemus, A., Nguyen, H.-O. B., Sussman, J., Wille, H., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Giles, K. (2011). Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(52), 21223-21228.

Sun, Y., Breydo, L., Makarava, N., Yang, Q., Bocharova, O. V., & Baskakov, I. V. (2007). Site-specific conformational studies of prion protein (PrP) amyloid fibrils revealed two cooperative folding domains within amyloid structure. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(12), 9090-9097.

Takegoshi, K., Nakamura, S., & Terao, T. (2001). 13C–1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters*, *344*(5), 631-637.

Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes & Development*, *10*(14), 1736-1750.

Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 9936-9940.

Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & 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*(1), 79-90.

Telling, Glenn C. (2010). Nucleic acid-free mutation of prion strains. *Prion*, *4*(4), 252-255.

Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C., & Gough, K. C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Veterinary Research*, *42*, 65.

Thakur, A. K., Srivastava, A. K., Srinivas, V., Chary, K. V. R., & Rao, C. M. (2011). Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38533-38545.

Tobler, I., Deboer, T., & Fischer, M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(5), 1869-1879.

Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., & Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, *380*(6575), 639-642.

Toni, M., Spisni, E., Griffoni, C., Santi, S., Riccio, M., Lenaz, P., & Tomasi, V. (2006). Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2006*(5), 69469.

Torrent, J., Martin, D., Noinville, S., Yin, Y., Doumic, M., Moudjou, M., Béringue, V., & Rezaei, H. (2019). Pressure Reveals Unique Conformational Features in Prion Protein Fibril Diversity. *Scientific Reports*, *9*(1), 2802.

Tousseyn, T., Bajsarowicz, K., Sánchez, H., Gheyara, A., Oehler, A., Geschwind, M., DeArmond, B., & DeArmond, S. J. (2015). Prion Disease Induces Alzheimer Disease-Like Neuropathologic Changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *74*(9), 873-888.

Tranulis, M. A., Osland, A., Bratberg, B., & Ulvund, M. J. (1999). Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *The Journal of General Virology*, *80 (Pt 4)*, 1073-1077.

Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E., & Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry*, *176*(1), 21-30.

Tycko, R., Savtchenko, R., Ostapchenko, V. G., Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2010). The α-helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel β-sheet structure in PrP fibrils : Evidence from solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, *49*(44), 9488-9497.

Vagin, O., Kraut, J. A., & Sachs, G. (2009). Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *296*(3), F459-469.

Valleron, A. J., Boelle, P. Y., Will, R., & Cesbron, J. Y. (2001). Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5547), 1726-1728.

van der Kamp, M. W., & Daggett, V. (2010). Pathogenic mutations in the hydrophobic core of the human prion protein can promote structural instability and misfolding. *Journal of Molecular Biology*, *404*(4), 732-748.

van Rheede, T., Smolenaars, M. M. W., Madsen, O., & de Jong, W. W. (2003). Molecular Evolution of the Mammalian Prion Protein. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(1),

Vázquez-Fernández, E., Alonso, J., Pastrana, M. A., Ramos, A., Stitz, L., Vidal, E., Dynin, I., Petsch, B., Silva, C. J., & Requena, J. R. (2012). Structural organization of mammalian prions as probed by limited proteolysis. *PloS One*, *7*(11), e50111.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., & Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United St*

Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S., & 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*(7), 4055-4059. h

Vilette, Didier. (2008). Cell models of prion infection. *Veterinary Research*, *39*(4), 10. h

Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., & Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *Journal of Virology*, *75*(13), 5977-5984.

Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J., & Checler, F. (2000). Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(45), 35612-35616.

Waddell, L., Greig, J., Mascarenhas, M., Otten, A., Corrin, T., & Hierlihy, K. (2018). Current evidence on the transmissibility of chronic wasting disease prions to humans—A systematic review. *Transboundary and emerging diseases*, *65*(1), 37-49.

Wadsworth, J. D., Joiner, S., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Fox, K., Cooper, S., Cronier, S., Asante, E. A., Mead, S., & Brandner, S. (2008). Kuru prions and sporadic Creutzfeldt–Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 3885-3890.

Wales, D. (2004). *Energy Landscapes : Applications to Clusters, Biomolecules and Glasses*. Cambridge University Press.

Walia, R., Ho, C. C., Lee, C., Gilch, S., & Schatzl, H. M. (2019). Gene-edited murine cell lines for propagation of chronic wasting disease prions. *Scientific Reports*, *9*(1), 11151.

Wälti, M. A., Ravotti, F., Arai, H., Glabe, C. G., Wall, J. S., Böckmann, A., Güntert, P., Meier, B. H., & Riek, R. (2016). Atomic-resolution structure of a disease-relevant Aβ(1-42) amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E4976-4984.

Wan, W., Wille, H., Stöhr, J., Kendall, A., Bian, W., McDonald, M., Tiggelaar, S., Watts, J. C., Prusiner, S. B., & Stubbs, G. (2015). Structural Studies of Truncated Forms of the Prion Protein PrP. *Biophysical Journal*, *108*(6), 1548-1554.

Wang, F., Wang, X., Yuan, C.-G., & Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5969), 1132-1135.

Wang, F., Yang, F., Hu, Y., Wang, X., Wang, X., Jin, C., & Ma, J. (2007). Lipid interaction converts prion protein to a PrPSc-like proteinase K-resistant conformation under physiological conditions. *Biochemistry*, *46*(23), 7045-7053.

Wang, L.-Q., Zhao, K., Yuan, H.-Y., Wang, Q., Guan, Z., Tao, J., Li, X.-N., Sun, Y., Yi, C.-W., Chen, J., Li, D., Zhang, D., Yin, P., Liu, C., & Liang, Y. (2020). Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human prion protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*(6), 598-602.

Watt, N. T., Taylor, D. R., Gillott, A., Thomas, D. A., Perera, W. S. S., & Hooper, N. M. (2005). Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(43), 35914-35921.

Watts, J. C., Drisaldi, B., Ng, V., Yang, J., Strome, B., Horne, P., Sy, M.-S., Yoong, L., Young, R., Mastrangelo, P., Bergeron, C., Fraser, P. E., Carlson, G. A., Mount, H. T. J., Schmitt-Ulms, G., & Westaway, D. (2007). The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *The EMBO Journal*, *26*(17), 4038-4050.

Watts, J. C., Giles, K., Bourkas, M. E. C., Patel, S., Oehler, A., Gavidia, M., Bhardwaj, S., Lee, J., & Prusiner, S. B. (2016). Towards authentic transgenic mouse models of heritable PrP prion diseases. *Acta Neuropathologica*, *132*(4), 593-610.

Watts, J. C., & Prusiner, S. B. (2014). Mouse Models for Studying the Formation and Propagation of Prions*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(29), 19841-19849.

Watts, J. C., & Prusiner, S. B. (2017). Experimental Models of Inherited PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(11).

Weber, P., Giese, A., Piening, N., Mitteregger, G., Thomzig, A., Beekes, M., & Kretzschmar, H. A. (2006). Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(43), 15818-15823.

Weingarth, M., Bodenhausen, G., & Tekely, P. (2010). Broadband magnetization transfer using moderate radio-frequency fields for NMR with very high static fields and spinning speeds. *Chemical Physics Letters*, *488*(1-3), 10-16.

Westaway, D., Genovesi, S., Daude, N., Brown, R., Lau, A., Lee, I., Mays, C. E., Coomaraswamy, J., Canine, B., Pitstick, R., Herbst, A., Yang, J., Ko, K. W. S., Schmitt-Ulms, G., Dearmond, S. J., McKenzie, D., Hood, L., & Carlson, G. A. (2011). Down-regulation of Shadoo in prion infections traces a pre-clinical event inversely related to PrP(Sc) accumulation. *PLoS Pathogens*, *7*(11), e1002391.

Westergard, L., Turnbaugh, J. A., & Harris, D. A. (2011). A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant-negative inhibitor of PrPSc formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(51), 44234-44242.

Westermark, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S.-I., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J., Sipe, J. D., & Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. (2005). Amyloid : Toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, *12*(1), 1-4.

Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein : Evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5158), 566-569.

Wickner, Reed B., Edskes, H. K., Son, M., Bezsonov, E. E., DeWilde, M., & Ducatez, M. (2018). Yeast Prions Compared to Functional Prions and Amyloids. *Journal of Molecular Biology*, *430*(20), 3707-3719.

Wickner, Reed B., Edskes, H. K., Son, M., Wu, S., & Niznikiewicz, M. (2020). How Do Yeast Cells Contend with Prions? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13).

Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy : Epidemiological studies on the origin. *The veterinary record*, *128*(9), 199-203.

Wilham, J. M., Orrú, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K. D., Taubner, L. M., Timmes, A., & Caughey, B. (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathogens*, *6*(12), e1001217.

Will, R. G, Ironside, J. W., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S. N., Smith, P. G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., & Hofman, A. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, *347*(9006), 921-925.

Will, Robert G. (2003). Acquired prion disease : Iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *British medical bulletin*, *66*(1), 255-265.

Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D. W., Bloch, L., Ollesch, J., Borovinskiy, A. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., & Stubbs, G. (2009). Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(40), 16990-16995.

Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., & Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3563-3568.

Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., & Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Experimental Neurology*, *144*(2), 433-438.

Williams, L., Brown, P., Ironside, J., Gibson, S., Will, R., Ritchie, D., Kreil, T. R., & Abee, C. (2007). Clinical, neuropathological and immunohistochemical features of sporadic and variant forms of Creutzfeldt-Jakob disease in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). *The Journal of General Virology*, *88*(Pt 2), 688-695.

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., & Sy, M. S. (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *Journal of Neurochemistry*, *76*(2), 565-572.

Wulf, M.-A., Senatore, A., & Aguzzi, A. (2017). The biological function of the cellular prion protein : An update. *BMC Biology*, *15*(1), 34.

Xu, Z., Liu, H., Wang, S., Zhang, Q., Yao, X., Zhou, S., & Liu, H. (2020). Unraveling the Molecular Mechanism of Prion H2 C-Terminus Misfolding by Metadynamics Simulations. *ACS Chemical Neuroscience*, *11*(5), 772-782.

Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., Schroetter, C. von, García, F. L., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., & Wüthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(1), 145-150.

Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N. M., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R. O., Cabral, A. L. B., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R., & Martins, V. R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal*, *21*(13), 3307-3316.

Zanusso, G., Monaco, S., Pocchiari, M., & Caughey, B. (2016). Advanced tests for early and accurate diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature Reviews Neurology*, *12*(6), 325-333.

Zhang, B., Shen, P., Yin, X., Dai, Y., Ding, M., & Cui, L. (2020). Expression and functions of cellular prion proteins in immunocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, *91*(3), e12854.

Zhou, M., Ottenberg, G., Sferrazza, G. F., & Lasmézas, C. I. (2012). Highly neurotoxic monomeric α-helical prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 3113-3118.

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Génération d'un nouveau prion spontané et analyse biologique et structurale des fibres amyloïdes lui correspondant.

Mots clés : Prions, fibres amyloïdes, mutation, RMN du solide, fragment C1 de la PrP

Résumé : Les prions résultent d'un changement de conformation de la protéine PrP et sont responsables de maladies neurodégénératives fatales et transmissibles, chez l'homme et l'animal. Sous sa forme prion, la PrP devient insoluble, résistante aux protéases et forme des agrégats riches en feuillet bêta. Les prions convertissent la PrP cellulaire normale en un élément du prion par simple contact, se multipliant ainsi dans le cerveau.
Nous montrons qu'une délétion raccourcissant l'hélice H2 de la PrP ovine réduit la stabilité de la protéine et induit sa conversion spontanée en un nouveau type de príon dans un modèle de culture cellulaire. Ce nouveau príon est capable de convertir la PrP mutante mais aussi son fragment C1.
Le C1 est une forme raccourcie de la PrP, tronquée en N-terminal par les métalloprotéases, mais est présent avec la PrP entière à la surface cellulaire. Le fragment C1 n'est pas converti par les souches classiques de prion et est considéré comme trop court pour former un prion. Nous montrons au contraire que le C1 de la PrP mutée peut adopter une structure prion auto-réplicative, résistante aux protéases et infectieuse. De plus, les fibres amyloïdes produites *in vitro* avec une PrP recombinante présentant la même délétion se sont comportées comme des prions synthétiques, induisant la conversion en prion de la PrP cellulaire homologue et de son fragment C1.
L'analyse des fibres par RMN du solide a montré un changement de conformation de la région C-terminale vers une forme enrichie en feuillet bêta.

Title : Generation of a new spontaneous prion and biological and structural analysis of the corresponding amyloid fibrils.

Keywords : Prions, amyloid fibrils, mutation, solid state NMR, PrP C1 fragment.

Abstract : Prions result from conformational change of the PrP protein and are responsible for fatal and transmissible neurodegenerative diseases in humans and animals. The modified form of PrP is insoluble, resistant to proteases and forms beta-sheet-rich aggregates. Prions convert the normal cellular PrP into a prion component by simple contact and thus expend in the brain.
We showed that a deletion shortening the H2 helix of ovine PrP reduces protein stability and induced its spontaneous conversion into a new type of prion in a cell culture model. This new príon produced transconformation of the mutant PrP and its C1 fragment.
C1 is a shortened form of PrP, N-terminally truncated by metalloproteases, but present with full-length PrP at the cell surface. The C1 fragment is not converted by classical prion strains and was considered too short to form a prion. Instead, we showed that the C1 of the mutant PrP can adopt a self-replicating, protease-resistant and infectious prion structure. Furthermore, amyloid fibrils produced *in vitro* with a recombinant PrP harboring the deletion behaved as synthetic prions, inducing the conversion of the homologous cellular PrP and its C1 fragment into prion.
Solid state NMR analysis of fibrils showed a conformational change to a beta-sheet enriched form in the C-terminal region.

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay
2ème étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay
4 avenue des Sciences,
91190 Gif sur Yvette, France