

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Évaluation expérimentale du risque prion lié aux porteurs
asymptomatiques chez l'Homme et le macaque

Ecole doctorale n°568

SIGNALISATION ET RESEAUX INTÉGRATIFS EN BIOLOGIE (BIOSIGNE)

Spécialité Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenu par Jessica **RONTARD**
le 16 février 2018

Dirigée par **Jean-Philippe DESLYS**

COMPOSITION DU JURY :

M. STEVANIN Giovanni
INSERM, Président du jury

Mme. MOUILLET-RICHARD Sophie
INSERM, Rapporteur

M. BARON Thierry
ANSES, Rapporteur

M. HAIK Stéphane
INSERM, Examineur

M. DESLYS Jean-Philippe
CEA, Directeur de thèse

M. COMOY Emmanuel
CEA, Invité

Remerciements

À monsieur le Docteur Giovanni Stevanin, je vous remercie d'avoir accepté la présidence de ce jury.

À madame le Docteur Sophie Mouillet-Richard et à monsieur le Docteur Thierry Baron, je vous remercie de me faire l'honneur d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Veuillez trouver ici ma sincère gratitude pour avoir pris le temps de juger mon travail.

À monsieur le Docteur Stéphane Haïk, je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir spontanément accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie également d'avoir fait partie de mon comité de mi-parcours et pour votre enthousiasme face à mon travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Jean-Philippe DESLYS, directeur du Service d'Étude des Prions et Infections Atypiques (SEPIA).

Cher monsieur, merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et permis de mener à bien ce travail de recherche. Sans vous, ce projet ne serait pas ce qu'il est devenu à ce jour.

Je tiens à remercier chaleureusement mon responsable de thèse, le Docteur Emmanuel COMOY. Merci d'avoir su vous rendre disponible pour m'expliquer et me réexpliquer certaines notions incomprises. J'ai été ravie de travailler à vous : un grand merci car sans vous rien n'aurait été possible !

Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude à Madame le Professeur Émérite Jacqueline Mikol. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Merci pour votre présence, soutien, générosité et du temps passé à scorer mes lames. Que de merveilleux résultats !

Un grand merci à l'ensemble des membres du SEPIA. Je souhaite particulièrement remercier Elodie : merci pour ton écoute, tes paroles rassurantes, nos moments de fous rires aussi. Jérôme, un grand merci pour ton aide qui fut la bienvenue au cours de cette dernière et extrêmement chargée année de thèse : merci pour toutes tes idées farfelues pour décalcifier les moelles résistantes. Steve, merci pour tes blots et ton œil expert en tératome. Valentina, merci d'être toi-même, tu me manqueras tant. Ferid, tu es le prochain : bon courage pour la suite ! Merci à l'ensemble de mes collègues : Dolorès, Serena, Denis, Agnès, Pierre, Sébastien et Françoise. Je remercie également tous ceux et celles parties précipitamment du laboratoire mais qui ont pour autant beaucoup comptés dans la réalisation de ce projet.

Merci à la plateforme « Ingénierie de la pluripotence » – laboratoire partenarial CEA/ SupBiotech. Rafika, merci pour nos différents échanges, ton partage de connaissance sur les cellules souches. Frank, merci à toi. Bon courage à tous dans la génération de cellules iPS, et merci de m'avoir fait partager ce monde à part des cellules souches pluripotentes.

Aux autres membres de l'Institut François Jacob, anciennement IMETI : Pascal, merci d'avoir su me comprendre et m'écouter dès le début, ta force et ta sagesse m'auront été extrêmement précieuses. Ma CriCri : je tiens à te remercier pour ton soutien et nos moments de fous rires, pour tes conseils en aménagement intérieur. J'ai été ravie de partager ces moments de culture à tes côtés. Tu vas beaucoup me manquer mais je sais qu'on se reverra très vite.

Merci aux différentes équipes avec lesquelles nous avons eu la chance de pouvoir collaborer. Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Leila Maouche Chrétien pour nous avoir généreusement fournies les cellules souches embryonnaires C57 ainsi que les cellules iPS de cynomolgus. Je remercie également le Docteur Étienne Levasseur qui a mené à bien l'ensemble des expériences en RT-QuIC. Enfin, un grand merci aux docteurs Daisy Bougard (EFS, Montpellier) et Olivier Andréoletti (INRA, Toulouse) ainsi que leurs collaborateurs pour leurs résultats très encourageants en PMCA.

Merci à ma famille d'avoir toujours su veiller sur moi. À mes deux mamies qui m'ont préparé de bons petits plats... Quelle chance j'ai eu de vous avoir à mes côtés pendant ces trois ans. À ma mère qui a toujours trouvé les mots, mon père (merci pour tous ses aller-retours), mes petits frères (presque aussi grands que moi !), Pachou, Christophe, ma sœur. À mon chéri qui ne lira jamais une ligne de ce manuscrit, qui n'a jamais rien compris à ce que je fais, mais qui m'aime et me soutient quand même : un immense merci à toi d'avoir accepté cette distance si pesante, et paraît-il ma mauvaise humeur passagère... (ou pas 😊).

Un grand merci à mes amis pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles. Mes meilleures amies de toujours : Aude, Amandine : c'était promis c'est maintenant chose faite ! Mes lyonnaises préférées, un grand merci pour votre soutien sans faille : mon lélépucien, ma dridine. Enfin, merci aux personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail qui est la finalité de trois années (et un mois) riches en émotion.

À mon papi parti beaucoup trop tôt, voici mon travail sur mes petites souris,

À ma famille, mes amis, mon chéri,

'L'homme devrait savoir que la joie, le plaisir, le rire et le divertissement, le chagrin, la peine, le découragement et les larmes ne peuvent venir que du cerveau. Ainsi, de façon singulière, nous acquérons sagesse et connaissance, nous pouvons voir et entendre, apprécier ce qui est intelligent ou sot, ce que sont le bien et le mal, ce qui est doux et ce qui est sans saveur...

C'est à cause du même organe que l'on peut devenir fou et dément et que la peur et l'angoisse nous assaillent... Tout ce qui se passe quand le cerveau est malade... Je considère que le cerveau exerce le plus grand pouvoir sur l'homme.'

Hippocrate. La maladie sacrée (IV^e siècle av. J.-C.)

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	i
TABLE DES MATIÈRES	iv
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	viii
TABLE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
Première partie : Généralités sur les maladies à prions.....	1
Chapitre I : Les maladies à prions.....	1
1- Des caractéristiques communes	2
2- Chez l'animal	4
2.1 La tremblante des petits ruminants	4
2.2 L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine	6
2.3 Les autres formes de maladies à prions animales.....	7
3- Chez l'Homme	8
3.1 Les formes sporadiques.....	9
3.2 Les formes génétiques	9
3.3 Les formes acquises.....	10
3.4 La variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob	13
3.5 Les méthodes de diagnostic ante mortem.....	14
3.6 Les autres formes de maladies à prions humaines	16
Chapitre II : La protéine prion	18
1- Historique de la découverte du Prion	18
2- La protéine prion physiologique.....	20
2.1 Structure, métabolisme et trafic de la protéine.....	20
2.2 Analogues structuraux de la PrP ^C	24
2.3 Expression embryonnaire et distribution de la PrP ^C dans l'organisme.....	25
2.4 Différentes fonctions de la PrP ^C	26
3- La protéine prion pathologique.....	31
3.1 Étude structurale de la PrP pathologique	32
3.2 Résistance aux procédés de décontaminations classiques.....	33
3.3 Le caractère transmissible.....	34
3.4 Notions de souche et de barrière d'espèce	34
Chapitre III : Pathogénèse des maladies à prions	37

1-	Conversion de la PrP ^C en PrP anormale.....	37
1.1	Lieux de conversion.....	37
1.2	Mécanismes de conversion et de réplication.....	38
1.3	Neurotoxicité des Prions	39
2-	Propagation des Prions au sein de l'organisme	40
2.1	De l'entrée du prion à l'accumulation dans les organes périphériques	40
2.2	Exemple du schéma pathogénique des ESTs suite à une contamination par voie orale	41
2.3	Des organes lymphoïdes à la réplication dans les cellules dendritiques folliculaires.....	42
2.4	Des organes lymphoïdes à la multiplication dans le système nerveux.....	43
2.5	Du système nerveux aux organes périphériques	45
	Deuxième partie : Évaluation et prévention du risque Prion en termes de santé publique.....	46
	Chapitre I : Analyse du risque de transmission primaire de la vMCJ	47
1-	Étude descriptive de la transmission de l'agent de l'ESB à l'Homme	47
1.1	Situation épidémiologique internationale et nationale	47
1.2	Présentation des cas non homozygotes méthionine sur le codon 129 et notion de porteurs asymptomatiques.....	49
2-	Mesures générales de prévention contre l'agent de l'ESB	50
3-	Étude analytique de la transmission de l'agent de l'ESB à l'Homme	51
3.1	Les modèles de prédiction mathématique	51
3.2	Les études de prévalence	51
4-	Théories expliquant la discordance entre la forte exposition et le nombre de patients vMCJ observé.....	55
	Chapitre II : Analyse du risque de transmission secondaire de la vMCJ	57
1-	Prionémie : infectiosité dans le sang.....	57
1.1	Présentation des transmissions expérimentales princeps.....	57
1.2	Détermination de la charge infectieuse	58
1.3	Détermination de la distribution cellulaire de l'infectiosité	59
2-	Épidémiologie descriptive des transmissions iatrogènes de vMCJ	59
2.1	Trois cas britanniques de transmission transfusionnelle de la vMCJ.....	59
2.2	Deux cas de porteurs asymptomatiques post-transfusionnels.....	61
2.3	D'autres cas non détectés ?	63
3-	Mesures générales de prévention et gestion du risque transfusionnelle.....	63
3.1	Mise en place d'une traçabilité	63
3.2	Critères d'inclusion et d'exclusion des donneurs.....	64
3.3	La leucoréduction.....	64

3.4 Les autres mesures.....	65
Troisième partie : Outils d'étude de la réplication dans les maladies à prions.....	67
Chapitre I : Modèles d'amplification acellulaires.....	68
1- La PMCA.....	68
2- La QuIC.....	69
Chapitre II : Les modèles animaux.....	70
1- Les rongeurs	70
2- Les primates non humains	73
Chapitre III : Les modèles cellulaires	76
1- Modèles cellulaires en deux dimensions.....	76
2- Modèles cellulaires en trois dimensions : les neurosphères.....	77
Chapitre IV : Un potentiel modèle alternatif, les organoïdes neuro-ectodermiques	79
1- Quelques définitions clefs	79
2- Les cellules souches pluripotentes induites	81
2.1 La reprogrammation cellulaire	82
2.2 La caractérisation des cellules iPS	85
3- Modélisation in vitro des maladies neurodégénératives.....	87
3.1 Modèles en deux dimensions : les cellules souches pluripotentes induites.....	87
3.2 Modèles en trois dimensions : les organoïdes neuro-ectodermiques.....	88
Quatrième partie : Problématique et objectifs du projet de thèse	90
Cinquième partie : Résultats	93
Chapitre I : Rappels des résultats précédemment obtenus.....	94
Chapitre II : Évaluation descriptive de la réplication périphérique (étude A).....	97
1- Apparition de phénotypes atypiques suite à des expositions périphériques	97
2- Caractérisation du modèle d'étude : souris NSG	116
2.1 Matériels et méthodes	116
2.2 Résultats.....	118
3- Vérification de la sensibilité des souris NSG aux souches de prions adaptées aux modèles rongeurs	120
3.1 Matériels et méthodes	120
3.2 Résultats.....	121
4- Passages secondaires : inoculations des homogénats des souris NSG exposées à des souris immunodéficientes et -compétentes.....	123
4.1 Matériels et méthodes.....	123
4.2 Résultats.....	124

5-	Étude descriptive des structures spléniques de plusieurs espèces.....	127
5.1	Matériels et méthodes.....	128
5.2	Résultats.....	129
6-	Discussion de l'étude A : Étude de la réplication périphérique	133
6.1	Étude de la réplication périphérique grâce aux souris NSG.....	133
6.2	Étude descriptive des structures spléniques.....	138
Chapitre III : Mise en place d'un modèle organoïde neuroectodermique en 3D d'infection (Étude B)		
.....		141
1-	Matériel et méthodes de l'étude B	141
1.1	Les cellules souches pluripotentes utilisées.....	141
1.2	Techniques de culture des cellules souches pluripotentes.....	142
1.3	Reprogrammation des cellules murines.....	144
1.4	Génération des organoïdes neuro-ectodermiques.....	147
1.5	Techniques de colorations	149
1.6	Exposition chronique des organoïdes cérébraux humains	151
1.7	Exposition aiguë des organoïdes neuro-ectodermiques.....	152
1.8	Détection de la réplication anormale dans les organoïdes exposés.....	153
2-	Résultats de l'étude B.....	155
2.1	Obtention et caractérisation des organoïdes cérébraux humains non exposés.....	155
2.2	Exposition chronique des organoïdes cérébraux humains : validation des MBs comme modèle d'infection prion.....	158
2.3	Obtention et caractérisation des organoïdes murins et simiens	162
2.4	Exposition aiguë des organoïdes neuroectodermiques.....	167
3-	Discussion de l'étude B : modèle d'exposition en 3D	172
3.1	Caractérisation des modèles cellulaires.....	172
3.2	Caractérisation du modèle cellulaire après exposition prion	175
3.3	Les limites des organoïdes cérébraux comme modèle d'infection.....	177
Discussion générale.....		179
Conclusion		191
Références bibliographiques.....		192

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Lésions histologiques du système nerveux chez des animaux ou des individus atteints de maladie à prions (d'après Aguzzi, 2001).....	3
Figure 2 : Nombre de cas d'ESB et de vMCJ au Royaume-Uni (RU) sur la période 1987-2016.....	13
Figure 3 : Similitudes lésionnelles entre un cerveau de macaque inoculé avec l'agent de l'ESB et celui d'un patient atteint de vMCJ (d'après Lasmézas et al., 1996).	14
Figure 4 : Représentation schématique de la PrP ^C murine (d'après Petit et al., 2013).....	21
Figure 5 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine prion cellulaire recombinante humaine (Zahn et al., 2000).	22
Figure 6 : Représentation des trois clivages protéolytiques de la PrP ^C (Atkinson et al., 2016).	23
Figure 7 : Structure de la protéine prion cellulaire et de ses analogues structuraux, Doppel et Shadoo (Ciric et Rezaei, 2015).....	24
Figure 8 : Gènes murins Prn situé sur le chromosome 2 et Sprn sur le chromosome 7 (d'après Watts et Westaway, 2007).....	24
Figure 9 : Principaux rôles mis en évidence pour la protéine prion cellulaire (PrP ^C).....	26
Figure 10 : Réimplantation chez le chimpanzé d'un jeu d'électrode incriminé dans des cas de contamination iatrogène de MCJ (d'après Weissmann et al., 2002).	33
Figure 11 : Processus de polymérisation d'une protéine soluble (forme physiologique) en son isoforme insoluble et anormalement repliée (forme pathologique) (d'après Fritschi et al., 2013).	38
Figure 12 : Deux modèles de conversion de la PrP ^C en son isoforme anormale (d'après Aguzzi, 2001).	38
Figure 13 : Représentation des différentes voies d'administration des Prions (d'après Aguzzi et al., 2013).....	41
Figure 14 : Représentation de la réplication périphérique dans les cellules dendritiques folliculaires situées dans les tissus lymphoïdes secondaires (d'après Aguzzi, Nuvolone, et Zhu, 2013).	42
Figure 15 : Voies de la neuroinvasion des prions (d'après Mabbott et MacPherson, 2006).	44
Figure 16 : Nombre de cas de variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) en France et au Royaume-Uni de 1995 à 2017 (d'après www.cjd.ed.ac.uk).	48
Figure 17 : Questionnaire français Pré-don établi par l'EFS (www.dondesang.efs.sante.fr).....	64
Figure 18 : Principales mesures de sécurisation des dons de sang.....	66
Figure 19 : Principes de fonctionnement de la PMCA et de la Rt-QuIC (d'après Zanusso et al. 2016).	68
Figure 20 : Arbre phylogénétique des primates.....	73
Figure 21 : Les neurosphères.....	77
Figure 22 : Potentiels de différenciation des cellules souches au cours de la vie.....	80
Figure 23 : Neurogenèse chez l'adulte (d'après Taupin, 2006).....	81
Figure 24 : Principales méthodes de reprogrammation des cellules matures en cellules souches pluripotentes induites.	83
Figure 25 : Méthodologie de génération des cellules souches pluripotentes induites (d'après Yamanaka, 2009).	85
Figure 26 : Caractérisation in vitro de la pluripotence des cellules iPS.....	86
Figure 27 : Dérivation en trois feuilletts embryonnaires d'un tératome (Takahashi et al., 2007).	87
Figure 28 : Mini-brain : organoïde cérébral, en trois dimensions, issu de cellules souches pluripotentes induites humaines (Lancaster et al., 2013).....	89

Figure 29: Mode opératoire d'inoculation d'agents infectieux par voie intraveineuse des macaques cynomolgus.	94
Figure 30 : Phénotypes observés chez les souris conventionnelles suite aux inoculations par voies intraveineuse et intracérébrale de souches classiques et atypiques (d'après Comoy et al., 2017).	96
Figure 31 : Détection par immunohistochimie des cellules immunitaires dans une rate de souris immunocompétente (modèle C57Bl/6).	118
Figure 32 : Coloration splénique en hématoxyline-éosine de modèles murins immunocompétents et immunodéficients.....	119
Figure 33 : Lésions caractéristiques d'une maladie à prions suite à une exposition centrale dans un modèle murin immunodéficient (Souris NSG).	121
Figure 34 : Lésions caractéristiques d'une maladie à prions suite à une exposition périphérique dans un modèle murin immuno-compétent et -déficient.	122
Figure 35 : Mode opératoire schématique des (re) transmissions in vivo.....	123
Figure 36 : Passages secondaires de souris immunodéficientes (NSG donneuses) à NSG.	124
Figure 37 : Passages secondaires de souris immunodéficientes (NSG donneuses) à Swiss.	125
Figure 38 : Triade lésionnelle chez une souris Swiss inoculée par voie intraveineuse avec de l'homogénat cérébral de souris NSG exposée à un homogénat infectieux de macaque vMCJ.....	126
Figure 39 : Accumulation anormale de PrP dans la rate des macaques transfusés.....	127
Figure 40 : Principales structures anatomiques de la rate.....	128
Figure 41 : Caractérisation des structures spléniques périvasculaires par coloration à l'orcéine chez un macaque sain.....	130
Figure 42 : Immunomarquage de la région périvasculaire chez un macaque vMCJ.....	130
Figure 43 : Caractérisation des structures spléniques périvasculaires grâce à la coloration à l'orcéine.	131
Figure 44: Immunodétection des muscles lisses de l'actine en périvasculaire.....	131
Figure 45 : Hypothèse de la réplication périphérique suite à une exposition par voie intraveineuse.	137
Figure 46 : Schématisation du mode opératoire d'obtention de cellules souches pluripotentes induites murines.....	144
Figure 47 : Mode opératoire de génération des corps embryoides grâce à la technique de la goutte pendante.	148
Figure 48 : Liste des milieux de culture utilisés dans la génération des organoïdes neuro-ectodermiques en fonction du stade de différenciation.	149
Figure 49 : Stratégies d'exposition des organoïdes neuro-ectodermiques.	151
Figure 50 : Protocole de génération des organoïdes cérébraux humains adapté du protocole de Lancaster et son équipe (d'après Lancaster et al., 2013).....	155
Figure 51 : Le modèle d'organoïde cérébral mime le neurodéveloppement humain.	156
Figure 52 : Caractérisation immunohistochimique des organoïdes humains 30 jours après la mise en Matrigel.	157
Figure 53 : Caractérisation immunohistochimique des organoïdes humains 45 jours après la mise en Matrigel.	157
Figure 54 : Évolution de l'infectiosité contenue dans les MBs humains exposés de façon chronique à un isolat infectieux.	159
Figure 55 : Conversion de la protéine prion recombinante par les mini-brains en RT-QuIC.	159

Figure 56 : Absence de distinction entre la PrP ^C endogène des organoïdes humains et la PrP anormale initialement ajoutée ou potentiellement néoformée.	160
Figure 57 : Détection de la PrP ^{Res} dans les organoïdes cérébraux humains exposés.	161
Figure 58 : Augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques dans les mini-brains humains exposés à des souches de prions humaines.	161
Figure 59 : Cellules murines extraites soit de la moelle osseuse soit de biopsie cutanée.	162
Figure 60 : Les cellules iPS 338 murines partiellement reprogrammées.	163
Figure 61 : Expression endogène des marqueurs de pluripotences dans les cellules murines par PCR.	164
Figure 62 : Trois feuilletts primaires d'un tératome issu de cellules souches pluripotentes induites simiennes.	164
Figure 63 : Aspect des colonies des cellules souches humaine, simienne et murines cultivées sur support nourricier.	165
Figure 64 : Comparaison des mini-brains issus de cellules humaines, murines et simiennes.	166
Figure 65 : Protocole d'exposition aiguë des organoïdes humains, murins et simiens.	167
Figure 66 : Coloration Perls sur les Mini-brains exposés à deux concentrations de billes Ademtech.	168
Figure 67 : Conversion de la protéine prion recombinante par les mini-brains humains exposés à une souche sporadique directement dans le milieu de culture en RT-QuIC.	169
Figure 68 : Organoïdes murins exposés de façon aiguë à une souche de tremblante adaptée.	171
Figure 69 : Principaux avantages et inconvénients des cultures cellulaires en deux et trois dimensions (d'après Qian et al., 2017).	172

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résistance à la tremblante des principaux génotypes chez le mouton.	5
Tableau 2 : Répartition du nombre de cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob suite à des accidents iatrogènes à l'échelle nationale et internationale.	12
Tableau 3 : Principales méthodes de diagnostic des maladies à prions humaines (d'après www.creutzfeldt-jakob.aphp.fr).	15
Tableau 4 : Souris délétées pour le gène <i>Prnp</i> générée de 1992 à 2016.	27
Tableau 5 : Description des différentes nomenclatures retrouvées dans la littérature du Prion	32
Tableau 6 : Comparaison des deux isoformes de la protéine prion (PrP).	32
Tableau 7 : Répartition mondiale du nombre de cas totaux de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) (d'après les données mises à jour le 03/07/2017 par <i>The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit</i> , eurocjd.ed.ac.uk).	47
Tableau 8 : Répartition des génotypes au codon 129 en fonction des formes de MCJ (d'après Brown <i>et al.</i> , 2012).	49
Tableau 9 : Présentation des cinq études de prévalence réalisées sur des pièces post-opératoires provenant de patients britanniques.	54
Tableau 10 : Présentation des trois cas transfusionnels	60
Tableau 11 : Nombre de patients MCJ ayant donné leur sang au Royaume-Uni avant le déclenchement des premiers signes cliniques (www.cjd.ed.ac.uk).	61
Tableau 12 : Présentation des deux porteurs asymptomatiques secondaires à des actes transfusionnels	62

Tableau 13 : Principales mesures d'exclusion des donneurs de sang en France.....	64
Tableau 14 : Avantages et limites des modèles murins dans l'étude de la physiopathologie des maladies à prions.....	70
Tableau 15 : Expositions expérimentales périphérique et centrale des souris immunodéficientes SCID.	72
Tableau 16 : Transmission de différentes souches de prion en fonction des voies d'inoculations dans les modèles simiens.....	74
Tableau 17 : Dérivation des trois feuillets embryonnaires.	79
Tableau 18 : Principales caractéristiques lésionnelles des macaques cynomolgus transfusés.	95
Tableau 19 : Anticorps utilisés dans la validation du caractère immunodéficient des souris NSG.....	117
Tableau 20 : Liste des anticorps utilisés par la caractérisation des rates.	128
Tableau 21 : Présentation des différents protocoles d'orcéine.	129
Tableau 22 : Principales conditions de culture des trois lignées de cellules souches pluripotentes utilisées.....	144
Tableau 23 : Ratio des différents vecteurs préconisé par le fabricant lors de la transduction par le virus de Sendai (Thermofisher, Kit CytoTune Sendai).	146
Tableau 24 : Liste des oligonucléotides utilisés dans la caractérisation des cellules souches murines par PCR.	147
Tableau 25 : Programme d'inclusion optimisé pour les organoïdes cérébraux.....	150
Tableau 26 : Liste des anticorps utilisés pour caractériser les mini-brains.....	150
Tableau 27 : Nombre de mini-brains humains exposés de façon chronique dans le Matrigel.....	160
Tableau 28 : Nombre total de Mini-brains humains exposés directement dans le milieu de culture (exposition aiguë) à différentes souches de prion.....	168
Tableau 29 : Nombre d'organoïdes murins exposés directement dans le milieu de culture (exposition aiguë) à différentes souches de prion adaptées à la souris.	170
Tableau 30 : Exposition des organoïdes issus des cellules souches pluripotentes simiennes.....	171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	Acide aminé	IPS	<i>Induced pluripotent stem</i> , -cellules-souches pluripotentes induites
ADN	Acide désoxyribonucléique	IV	Intraveineuse
ATNC ...	Agent transmissible non conventionnel	IRM	Imagerie par résonance magnétique
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> , facteur de croissance des fibroblastes basique	JPE	Jour post-exposition
BHE	Barrière hémato-encéphalique	KDa	Kilo Dalton
BrdU	Bromo-deoxyuridine	Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i> , facteur de type doigt de zinc (Kruppel)
CGR	Concentré de globules rouges	Ko	<i>Knock out</i>
CS	Cellule souche	LB	Lymphocyte B
CWD	<i>Chronic wasting disease</i> , maladie du dépérissement chronique	LCR	Liquide céphalorachidien
Dpl	Doppel	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> , facteur inhibiteur de leucémie
DL50 ...	Dose létale 50	LT	Lymphocyte T
EB	<i>Embryoid body</i> , corps embryoïde	M	Méthionine
EEG	Electroencéphalogramme	MB	<i>Mini-brain</i>
EFS	Etablissement français du sang	MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine	MDS	Médicament dérivé du sang
EST	Encéphalopathie spongiforme transmissible	MEF	<i>Mouse embryonic fibroblastes</i> , fibroblastes embryonnaires de souris
FDC	Cellule folliculaire dendritique	Myc	<i>Myelocytomatosis</i> , myelocymatose
GFAP ...	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , protéine glio-fibrillaire acide	NK	<i>Natural killer</i> , -cellule- « tueuse naturelle »
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol	Oct3/4 .	<i>Octamer-binding transcription factor 3/ 4</i> , facteur 3/4 de transcription se liant à l'octamère
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker	OMS	Organisation mondiale de la santé
HE	Hématoxyline-éosine	PK	Protéinase K
IFF	Insomnie fatale familiale	PMCA ..	<i>Protein misfolding cyclic amplification</i> , amplification cyclique des protéines mal repliées
IHC	Immunohistochimie	PNH	Primate non humain
IP	Intrapéritonéale	PrP	Protéine prion

- PrP^C**..... Protéine prion cellulaire
PrP^{res}... Protéine prion résistance à la
protéolyse
Prnp.... Gène codant pour la protéine prion
PrP^{Sc}.... Protéine prion infectieuse,
initialement décrite dans la
tremblante du mouton (*Scrapie* en
anglais)
PSL..... Produit sanguin labile
- QuIC**.... *Quaking induced conversion*,
conversion induite par agitation
- RE**..... Réticulum endoplasmique
RU..... Royaume-Uni
**Rt-
QuIC**.... *Real-time quaking induced
conversion*, conversion induite par
agitation en temps réel
- SAF**..... *Scrapie associated fibril*,
Sox2.... *Sex determining region Y-box 2*,
facteur de détermination du sexe
mâle
SN..... Système nerveux
SNC.... Système nerveux central
- TME**.... *Transmissible mink
encephalopathy, encéphalopathie
transmissible du vison*
- UE**..... Union européenne
- V**..... Valine
vMCJ... Variante de la maladie de
Creutzfeldt-Jakob
VPSPr *Variably protease-sensitive
prionopathy*, prionopathie à
sensibilité variable à la protéolyse
- WB**..... *Western blot*

Première partie : Généralités sur les maladies à prions

Chapitre I : Les maladies à prions

Les maladies à prions, encore appelées Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (ESTs), sont un groupe de pathologies neurodégénératives touchant à la fois l'Homme et l'animal. Elles ont été décrites chez de nombreux mammifères : bovins, caprins, cervidés, félins, ovins et visons. Chez l'Homme, plusieurs formes distinctes d'ESTs ont été dénombrées, reposant sur différents critères épidémiologiques, cliniques, biochimiques et génétiques.

Quelle que soit l'espèce touchée, ces pathologies présentent de nombreuses caractéristiques communes, à savoir ([Lampert, Gajdusek et Gibbs, 1972](#)) :

- **Leur caractère transmissible** suite à l'exposition naturelle ou expérimentale à un organe infecté ;
- **Une longue phase d'incubation silencieuse** (asymptomatique) pouvant durer plusieurs années chez l'Homme suivie d'une détérioration rapide et irréversible de l'état de santé du patient une fois le déclenchement des symptômes ;
- **Une encéphalopathie** c'est-à-dire une atteinte de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et de la moelle épinière, associée à une absence de réaction immunitaire détectable contrairement aux encéphalites ;
- **Une triade lésionnelle du système nerveux central (SNC)** : spongiose, gliose et perte neuronale ;
- **Une accumulation de la protéine prion (PrP) de l'hôte dans une conformation anormale** ([Prusiner 1982](#)) ;
- **Une issue systématiquement fatale** de l'individu quel que soit le traitement mis en œuvre.

1- Des caractéristiques communes

Les ESTs sont des maladies chroniques à évolution subaiguë. Ce terme fait référence à un **tableau clinique divisé en deux phases**, une première asymptomatique caractérisée par une longue période d'incubation suivie d'une phase symptomatique associée à une dégradation rapide de l'état de santé du patient.

La phase asymptomatique est longue au regard de l'espérance de vie des différentes espèces atteintes. Elle peut s'étendre de quelques mois chez l'animal à des années voire des décennies chez l'Homme, comme ce fut le cas pour des patients ayant développé un Kuru, 50 ans après l'ingestion d'aliments contaminés (Collinge *et al.*, 2006). Pourtant aucune réaction du système immunitaire n'est détectée : absence de réponse systémique (fièvre, inflammation) et de marqueur biologique (production d'anticorps, infiltration de cellules immunitaires périphériques vers le SNC). Cette phase préclinique n'est pas pour autant inactive puisqu'il a été démontré que l'agent se réplique silencieusement dans les organes périphériques avant d'envahir le SNC.

La phase symptomatique dépend du type de la maladie mais inclut généralement des troubles psychiatriques et neurologiques sévères (Thompson *et al.*, 2014). Ces signes cliniques reflètent l'atteinte cérébrale majeure et irréversible. Face à l'absence de traitement efficace, les maladies à prions, quelle que soit l'espèce considérée évoluent rapidement et sans rémission jusqu'à la mort de l'individu.

L'analyse *post-mortem* du SNC d'un individu atteint de maladie à prions permet de révéler une triade lésionnelle histologique de la substance grise : **spongieuse, perte neuronale et gliose**. Ces critères neuropathologiques isolés ne sont pas spécifiques, seule la présence de ces trois éléments est évocatrice d'une maladie à prion. La spongieuse correspond à des vacuolisations conférant au cerveau, examiné au microscope, un aspect général « troué » tel une éponge, d'où le qualificatif (Figure 1). La vacuolisation est située dans le neuropile, ou au niveau des dendrites et plus rarement dans les axones et le corps cellulaire des neurones, ou soma (Jeffrey *et al.*, 1992). La microscopie a permis de montrer que le diamètre des vacuoles est compris entre 5 et 40 µm.

Une perte neuronale est également décrite. Elle est associée aux troubles cognitifs sévères décrits dans les ESTs (Mallucci *et al.*, 2003). Dans certaines formes de maladie à prions, la perte neuronale peut être importante et conduire à une atrophie cérébrale (Fraser *et al.*, 1996). L'absence d'infiltrat lymphocytaire et macrophagique en périphérie de la lésion a permis de suggérer que la perte neuronale était associée à une mort par apoptose (implication notamment de la caspase 3). Les travaux de Gray et ses collaborateurs confirmeront ces données en détectant des neurones apoptotiques autour des lésions neuronales dans le cerveau de patients atteints de MCJ (Gray *et al.*, 1999).

Une gliose est retrouvée dans les cellules astrocytaires et microgliales, les deux principaux médiateurs cellulaires de la neuroinflammation. L'astrogliose se caractérise par une hypertrophie des corps cellulaires et une augmentation des prolongements astrocytaires (hyperplasie), comme le souligne la surexpression de la protéine acide fibrillaire gliale (*Glial Fibrillary Acid Protein*, GFAP) (Figure 1). À cette astrogliose s'associe une prolifération des cellules microgliales – macrophagiques. L'activation gliale et la dégénérescence neuronale précèdent l'apparition des lésions vacuolaires (Pattison, 1965 ; Hadlow, 1961 ; Pattison et Smith, 1963 ; Betmouni *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 1997 ; Giese *et al.*, 1998).

Le seul critère neuropathologique connu à ce jour pour caractériser spécifiquement les maladies à prions est l'**accumulation de la protéine prion (PrP) anormalement conformée de l'hôte** (Figure 1). Elle est détectable par des techniques immunohistochimiques (IHC) et biochimiques.

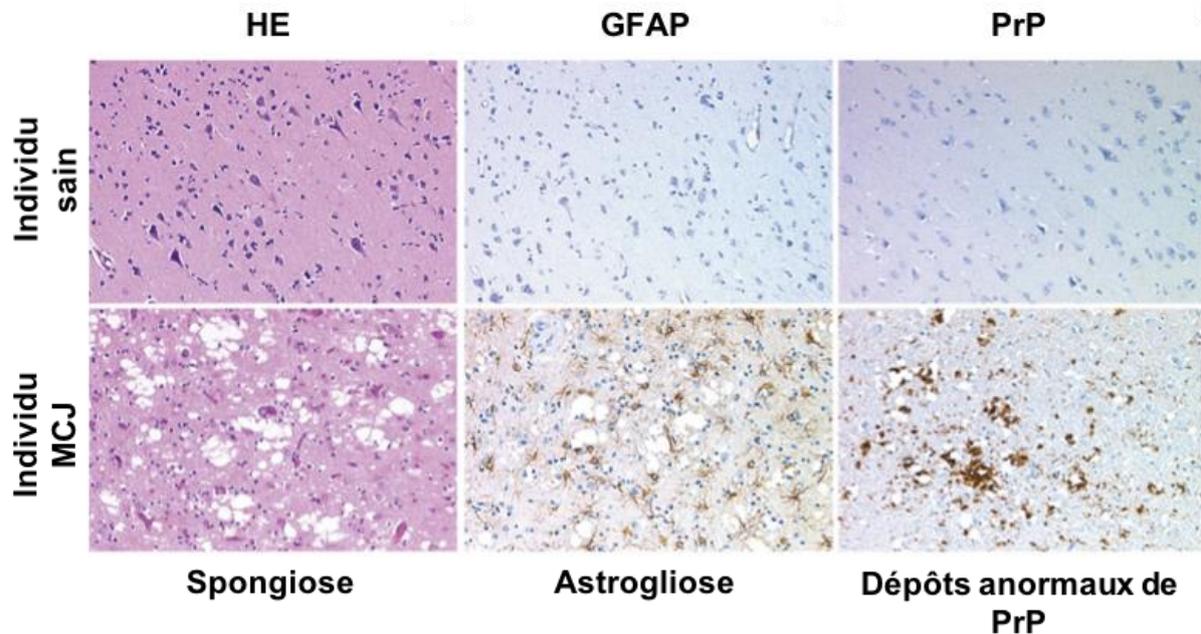


Figure 1 : Lésions histologiques du système nerveux chez des animaux ou des individus atteints de maladie à prions (d'après Aguzzi, 2001).

La spongiose est mise en évidence par coloration en hématoxyline éosine (HE). L'activation astrocytaire (ou astroglie) est détectable par une augmentation du marqueur GFAP (protéine acide fibrillaire gliale). Les dépôts anormaux de protéine prion (PrP) sont uniquement retrouvés chez les individus atteints de maladie à prions.

Dans les maladies à prions, des dépôts amyloïdes¹ sont détectés. Ils correspondent à l'accumulation anormale de protéines insolubles et fibrillaires, normalement dégradées par l'organisme en condition physiologique. En histologie, ces dépôts anormaux ont des propriétés tinctoriales (capacité de biréfringence à la lumière polarisée d'un microscope) permettant une mise en évidence par coloration au rouge Congo. L'analyse en microscopie électronique met en évidence la présence de structures fibrillaires enrichies en feuillets bêta.

Bien que les lésions soient uniquement restreintes au SNC, la PrP anormale est capable de **s'accumuler et même de se répliquer dans les organes lymphoïdes** (rate, ganglions lymphatiques). Sa dissémination dans l'organisme est dépendante de la porte d'entrée du prion et fera l'objet d'une description plus importante dans le troisième chapitre de ce manuscrit². Ces maladies ont été montrées comme **transmissibles** et sont considérées comme infectieuses. L'agent causal des maladies à prions est connu pour son extrême résistance aux procédés de décontamination classiquement utilisés, et sa capacité, dans certains cas, à franchir les barrières d'espèces. Ce point révèle la complexité et le risque en termes de santé publique de ces pathologies.

¹L'amyloïde, un terme générique, utilisé pour décrire les changements de conformations d'une protéine sous forme de dépôts extracellulaires caractérisés par une forte insolubilité, un enrichissement en feuillets β , la présence de structures fibrillaires et une biréfringence après coloration au Rouge Congo.

²Première partie - Chapitre III : Pathogénèse des maladies à prions (pages 37 à 45).

2- Chez l'animal

2.1 La tremblante des petits ruminants

La tremblante des petits ruminants (caprins et ovins) est décrite sous une forme dite « classique » en opposition à la tremblante atypique mise en évidence plus tardivement grâce à l'utilisation des tests rapides de dépistage.

La forme classique

Dès 1732, des récits relatent la présence d'animaux atteints de la tremblante d'abord en Angleterre (Besnoit et Morel, 1898 ; Plummer, 1946 ; pour revue Schneider *et al.*, 2008). L'augmentation du nombre de cas conduira à d'importantes conséquences économiques en Angleterre où le commerce de la laine était très présent.

La tremblante touche des individus généralement âgés de deux à cinq ans. Elle est caractérisée par des tremblements de la tête et des troubles sensitifs associés à d'importantes lésions de grattage avec prurit d'où son appellation commune de *Scrapie* en anglais³. Des troubles moteurs et visuels, une perte de poids ainsi que des difficultés respiratoires (dyspnée) sont également retrouvés. La durée d'évolution clinique est rapide et le décès de l'animal est observé en moyenne deux mois après le déclenchement des signes cliniques. La tremblante a des allures endémiques (Detwiler et Baylis, 2003) et l'ensemble des pays ont rapporté la présence d'animaux infectés à l'exception de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande (Kittelberger *et al.*, 2010). Des foyers de tremblante sont encore aujourd'hui observés : en 2013, six cas ont été recensés en France (2/58 715 caprins et 4/50 467 ovins) (site du ministère de l'agriculture et de l'alimentation : www.agriculture.gouv.fr).

L'agent causal de la tremblante présente la particularité d'être disséminé, en plus du SN, dans l'ensemble de l'organisme : la rate, l'intestin, les ganglions, le placenta, le sang ainsi que le lait et le colostrum (Lacroux *et al.*, 2008 ; Andréoletti *et al.*, 2012). Cette large dissémination explique la diversité des modes de transmission. La contamination peut être intra- et inter-espèce au sein des petits ruminants et semble se faire principalement de la mère à sa progéniture (Andréoletti *et al.*, 2002) : de façon verticale lors de la mise-bas, ou horizontale via la consommation des annexes fœtales particulièrement infectieuses (placentophagie). La fréquence de transmission de la tremblante entre sujets adultes est plus faible mais connue (Ryder *et al.*, 2004). Des données expérimentales révèlent la possibilité d'une infection suite à des scarifications cutanées, bien que cela n'ait jamais été confirmé de façon naturelle (Carp et Callahan, 1982 ; Taylor *et al.*, 1996 ; Mohan *et al.*, 2005). Il a été montré que l'agent est extrêmement résistant dans l'environnement. Ainsi, des champs dits « maudits » contaminés par des fèces d'animaux eux-mêmes infectés peuvent être laissés en jachère pendant plusieurs années, et contaminer un nouveau cheptel (Dexter *et al.*, 2009). En 1936, les expériences de deux vétérinaires français, Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle, démontrent la transmissibilité de l'agent responsable de la tremblante par injection intracérébrale (IC) d'un broyat de cerveau provenant d'un animal malade à des moutons sains (Cuillé et Chelle, 1936). Le risque zoonotique de la tremblante à l'Homme a été évalué *in vivo*. Par voie intracérébrale, la transmissibilité de l'agent est efficace chez le singe marmouset (Baker *et al.*, 1993) ; chez le macaque cynomolgus c'est après une plus longue période d'incubation (Comoy *et al.*, 2015).

³ La tremblante est nommée *Scrapie* en anglais en référence au verbe *to scrape* signifiant se gratter.

Les expériences de Cassard et ses collègues ont mis en évidence la transmissibilité de l'agent à des souris humanisées (Cassard *et al.*, 2014). Jusqu'alors, aucun cas de transmission à l'Homme n'a été rapporté et la tremblante n'est donc pas considérée comme une zoonose. Toutefois, le principe de précaution a conduit les autorités françaises à rendre cette maladie à déclaration obligatoire depuis le 14 juin 1996. Des mesures sanitaires ont été prises en vue d'éradiquer les foyers d'infection : lorsqu'un cas est détecté une partie du cheptel pourra être éliminée.

En parallèle, des mesures préventives de sélection génétique ont été mises en place en France sous la forme du programme national d'amélioration génétique pour la résistance à la tremblante, et plus largement en Europe. Il a été découvert que le gène *Prnp*, codant pour la PrP, influence la susceptibilité à développer la tremblante « classique ». Plus particulièrement, l'apparition de la maladie est fortement liée au polymorphisme situé sur les codons 136 (A ou V), 154 (R ou H) et 171 (Q, H, ou R) définissant cinq allèles (VRQ, ARQ, ARH, AHQ, ARR) (Tableau 1). L'objectif est de promouvoir les animaux à génotype dit « résistant » ARR et de diminuer le nombre d'animaux présentant un génotype VRQ dit « sensible » au développement de la tremblante (Brochard, 2005 ; Dupres, 2011). Néanmoins, des cas de tremblante sont connus chez des individus avec des génotypes dits « résistants » (Groschup *et al.*, 2007).

Des programmes officiels de surveillance ont également été instaurés en testant les caprins et ovins présentant des signes cliniques et/ ou ceux abattus, réformés ou retrouvés morts.

Tableau 1 : Résistance à la tremblante des principaux génotypes chez le mouton.

Génotype du mouton	ARR/ ARR	AHQ/ ARH/ ARQ	VRQ/ VRQ
Échelle de résistance à la tremblante classique	Résistant*	Intermédiaire	Hautement sensible

*Le génotype ARR est sensible à la tremblante atypique

La tremblante atypique ou Nor98

La tremblante atypique a été décrite pour la première fois en 1998 en Norvège, d'où la dénomination Nor98 (Tranulis *et al.*, 1999). Elle diffère de la forme classique d'un point de vue clinique, pathologique, biochimique et épidémiologique.

Avant les campagnes de dépistage actif, les cas de tremblante atypique n'étaient pas détectés (Fediaevsky *et al.*, 2008). Cela peut s'expliquer par la présence de signes cliniques peu prononcés et non associés à des tremblements ou des prurits. On observe le plus souvent un dépérissement (amaigrissement, changement de comportement), une ataxie et une marche anormale. Les animaux atteints sont généralement plus âgés que dans la forme classique (Lühken *et al.*, 2007 ; Benestad *et al.*, 2008) : ayant probablement pour conséquence l'euthanasie de l'animal (liée à sa durée de vie économique) avant qu'il ait eu le temps de développer la maladie. La tremblante atypique est aussi retrouvée chez des moutons homozygotes ARR alors que ce phénotype est connu pour être résistant à la tremblante classique (Tableau 1). Contrairement à la forme classique, des cas de tremblante atypique ont été signalés en Australie et en Nouvelle-Zélande (Kittelberger *et al.*, 2010). Des différences biochimiques ont été mises en évidence entre les agents de la tremblante classique et atypique (Buschmann *et al.*, 2004 ; Le Dur *et al.*, 2005). Ces données symptomatologiques et biochimiques ainsi que celles concernant la répartition géographique suggèrent une origine différente des deux formes. Une des hypothèses avancées est que la tremblante atypique serait une maladie neurodégénérative spontanée des ovins âgés (Lühken *et al.*, 2007). Cette origine endogène serait influencée par des facteurs génétiques, environnementaux et métaboliques.

Toutefois, au terme de longues périodes d'incubation, la tremblante atypique est transmissible dans des modèles murins (Le Dur *et al.*, 2005 ; Simmons *et al.*, 2007) et chez le mouton (Simmons *et al.*, 2011). L'analyse rétrospective de cerveaux de mouton en IHC révèle la présence de cas positifs dès 1987 sur le territoire anglais (Webb *et al.*, 2009). En 2013, 12 cas ont été recensés sur le territoire français (3/58 715 caprins et 9/50 467 ovins, www.agriculture.gouv).

2.2 L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine

Tout comme la tremblante des petits ruminants, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) est présente sous une forme dite « classique » et une autre atypique dont deux souches distinctes ont été décrites.

La forme classique

L'ESB a été décrite pour la première fois en 1986 au Royaume Uni (RU). Depuis, elle a été observée dans plus de 19 pays, dont la France (Wells *et al.*, 1987). Baptisée « maladie de la vache folle », elle touche généralement des bovins âgés de trois à six ans (Sala *et al.*, 2012). La phase clinique débute par un changement de comportement associé à une hyperexcitabilité, suivi de troubles moteurs (Wilesmith *et al.*, 1992).

Les données épidémiologiques ont rapidement établi un lien entre l'ESB et la consommation de farines de viande et d'os (FVO). Ces dernières communément appelées farines animales provenaient de carcasses recyclées de bovins (85%) et de moutons (15%) ainsi que des déchets des ateliers d'équarrissage. Ces farines animales étaient réintroduites dans l'alimentation animale, notamment bovine, sous forme de compléments protéiques (Wilesmith *et al.*, 1991). Dans les années 70, le contexte des chocs pétroliers a conduit le RU à diminuer leurs coûts de production des farines animales notamment en abaissant la température des procédés de fabrication (Deslys et Picot, 2001). En parallèle, l'hexane, traitement classiquement utilisé pour extraire les graisses des farines, a été supprimé. Ces modifications de fabrication, qui continuaient à être efficaces vis-à-vis des bactéries et des virus et à garantir une forte teneur en sels minéraux et en protéines, ont conduit à une absence d'inactivation de l'agent de l'ESB. L'origine de la contamination initiale n'est pas entièrement comprise et deux hypothèses sont envisagées. Les farines animales ont pu être contaminées à partir : (i) de carcasses de moutons atteints de tremblante ou (ii) d'un cas spontané d'ESB introduit dans la chaîne de fabrication. La commercialisation d'animaux infectés en phase asymptomatique et de complément alimentaire issues de farines animales ont conduit à la propagation rapide de l'ESB dans les autres pays.

Cette anazootie⁴ a eu d'importantes répercussions économiques associées à une destruction complète des cheptels, une image négative des éleveurs et une diminution de la consommation de viande de la part des consommateurs. Tout comme la tremblante, l'ESB est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1996 en France. Elle a officiellement touché environ 200 000 bovins dont 94% au RU (184 627 cas) et 6041 cas dans le reste du monde avec 1036 cas en France (données issues de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, OMS). Depuis le 30 juin 2016, deux cas ont été rapportés : un premier en Espagne et un second en France. Ce nombre est très faible mais ce sont deux animaux nés plus de 10 ans après l'interdiction de l'utilisation des farines animales. L'origine de ces cas reste inexpliquée suggérant soit un autre mode de contamination non identifié à ce jour soit la persistance de l'agent de l'ESB sous une forme sporadique.

⁴L'anazootie correspond à une maladie ayant une seule et même origine commune.

Les formes atypiques

De façon comparable à la découverte de la tremblante atypique, les tests de dépistage des ruminants ont permis la mise en évidence de formes atypiques d'ESB jusqu'alors ignorées. Elles sont rares et affectent des bovins âgés en moyenne de 12 ans (Sala *et al.*, 2012). De 2010 au 30 juin 2016, 24 cas ont été détectés dans le monde (OMS). La caractérisation des souches impliquées dans les maladies à prions permet de définir des signatures typiques en Western blot (WB). L'analyse des échantillons d'ESB atypique grâce à cette technique révèle la présence de la forme anormale de la PrP sous deux nouveaux profils électrophorétiques différents de celui de l'ESB dite « classique » : le type L, pour « Low » dont le poids moléculaire des bandes est inférieur à celui observé pour l'ESB classique et le type H pour « High » qui a, inversement, une taille supérieure. Très rapidement après la découverte de ces deux profils, une origine commune à l'ESB « classique » a été suggérée. Des études de transmission à des souris transgéniques soulignent des ressemblances biochimiques entre l'ESB classique et la forme atypique de type L (Béringue *et al.*, 2007 ; Capobianco *et al.*, 2007) et de type H (Baron *et al.*, 2011 ; Torres *et al.*, 2011). Ces données semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle les formes atypiques seraient à l'origine de la forme classique de l'ESB.

Décrit pour la première fois en Italie, le type L a initialement été appelé BASE, de l'anglais *Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy*, en référence à une importante quantité de plaques amyloïdes de PrP anormale retrouvée dans le SNC des deux bovins analysés (Casalone *et al.*, 2004). La transmission de l'agent de l'ESB de type L est très efficace *in vivo*, que ce soit chez les bovins (Lombardi *et al.* 2008 ; Okada *et al.*, 2011), les primates non humains, PNH (Comoy *et al.*, 2008 ; Mestre-Francés *et al.*, 2012), ou les souris transgéniques sur-exprimant la PrP humaine ou ovine (Buschmann *et al.*, 2006). Ces données laissent craindre un risque en termes de santé publique. Cet agent n'est pas transmissible aux souris conventionnelles (Capobianco *et al.*, 2007).

Le type H a initialement été décrit en France, puis retrouvé dans d'autres pays européens (Biacabe *et al.*, 2004). L'évaluation du potentiel zoonotique de cet agent dans un modèle murin humanisé souligne l'absence de transmission de la maladie (Béringue, Herzog, *et al.*, 2008). Ainsi, l'agent de l'ESB de type H, contrairement au type L, ne semble pas présenter de risque en termes de santé publique.

2.3 Les autres formes de maladies à prions animales

Les autres ESTs animales ont touché moins de cas que ceux rapportés pour la tremblante et l'ESB.

Des cas d'**Encéphalopathie Spongiforme Féline** ont été recensés au RU dès 1990 chez les chats domestiques âgés en moyenne de quatre à neuf ans (Aldhous, 1990 ; Wyatt *et al.*, 1991). Différents zoos ont également fait état de contamination au sein de félins sauvages (guépard, lion, ocelot, puma, et tigre) (Kirkwood *et Cunningham*, 1994). Les symptômes sont principalement un changement de comportement, une agressivité, une ataxie ainsi qu'une hyperesthésie. Environ 100 cas ont été rapportés avec une période d'incubation moyenne de cinq ans. Il semblerait que l'agent responsable de l'ESB se soit retrouvé dans leur alimentation soit par l'ingestion de croquettes contenant des farines animales contaminées soit en nourrissant directement les grands félins avec des carcasses infectées. Ainsi, l'agent responsable de l'ESB a réussi à franchir la barrière d'espèce bovin-félin.

L'**Encéphalopathie Spongiforme du vison**, de l'anglais *Transmissible Mink Encephalopathy* (TME) a été observée pour la première fois en 1947 dans une ferme de l'état du Wisconsin, aux États-Unis (Hartsough et Burger, 1965).

Les principaux symptômes sont un amaigrissement et une hyperexcitabilité. La période d'incubation s'étend de six à douze mois. L'origine exacte de la contamination est encore peu comprise. L'une des hypothèses est qu'elle soit liée à une contamination par voie orale suite à l'ingestion de carcasses issues de bovins infectés par de l'ESB atypique. En effet, des transmissions expérimentales à des souris transgéniques ((T. Baron et al. 2007) et au macaque cynomolgus (Comoy et al., 2013) révèlent la présence de similarités biochimiques entre l'agent de la TME et celui de l'ESB de type L.

Le **dépérissement chronique des cervidés**, de l'anglais *Chronic Wasting Disease* (CWD), a été décrit pour la première fois dans le Colorado en 1967 (Williams, 2005). La CWD affecte les cervidés en captivités et sauvages (caribou, cerf de Virginie, cerf-mulet, élan, rennes, wapiti) âgés de trois à sept ans (Miller, Wild, et Williams, 1998 ; Williams, 2005 ; Sigurdson et Aguzzi, 2007). À ce jour, c'est la seule EST présente de façon naturelle chez des animaux sauvages. Les cervidés présentent un amaigrissement, un dépérissement progressif ainsi qu'une salivation excessive. La période clinique est d'environ trois mois ce qui est rapide par rapport aux autres ESTs.

La CWD présente de nombreux points communs avec la tremblante notamment au niveau de la physiopathologie. L'agent causal est retrouvé dans l'urine, les fèces, la salive, le sang et les bois (pour revue Waddell et al., 2017). La dissémination précoce de l'infectiosité dans les organes périphériques semble favoriser la transmission rapide au sein du troupeau. Les études épidémiologiques font état d'une exportation de cas d'animaux infectés en phase asymptomatique du Canada vers la Corée du Sud (Kim et al., 2005).

En avril 2016, le premier cas de renne infecté a été détecté en Norvège. Depuis, les dernières données confirment trois autres cas : deux élans (mai 2016) et un caribou (août, 2016). Les autorités européennes compétentes ont décidé d'augmenter les mesures de prévention afin de limiter la propagation de l'agent en autorisant l'extermination des foyers d'infection. Précisons que les cervidés sont consommés en Amérique, notamment par les chasseurs. Pour l'heure aucune donnée expérimentale publiée n'a permis de montrer une transmission de l'agent responsable de la CWD à l'Homme sauf chez le singe écureuil (qui reste éloigné phylogénétiquement de l'Homme) par voie intracérébrale (Marsh et al., 2005 ; Race et al., 2009 ; Race et al., 2014).

3- Chez l'Homme

Les ESTs humaines sont rares : on compte environ 110 cas en France chaque année (Institut National de Veille Sanitaire, InVS, www.invs.santepubliquefrance). Depuis le 19 septembre 1996, les maladies à prions humaines sont à déclaration obligatoire en France. Elles incluent l'insomnie fatale familiale (IFF), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), le Kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Cette dernière découverte par deux neurologues allemands, Hans Creutzfeldt en 1920 et Alfons Jakob en 1921, se présente sous trois formes :

- Les **formes sporadiques**, les plus fréquentes (85%) ;
- Les **formes génétiques** dites familiales (10 %) ;
- Les **formes acquises** (5%), regroupant la vMCJ, les cas de contaminations iatrogènes ainsi que le Kuru qui a totalement disparu.

D'une façon générale, les patients présentent des atteintes psychiatriques (démence) et neurologiques telles qu'une perte de motricité et de la parole. Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible et ces pathologies sont systématiquement fatales.

En l'absence de biomarqueurs spécifiques détectables et donc de techniques de dépistage applicables en routine et en *ante mortem*⁵, le diagnostic de certitude n'est posé qu'à la mort de l'individu lors notamment de l'examen neuropathologique.

3.1 Les formes sporadiques

Le terme « sporadique » désigne une apparition de cas isolés dont les causes extérieures n'ont pas été identifiées. Ces formes sont donc considérées comme spontanées.

L'incidence annuelle des MCJ sporadique est de 1 à 2 cas par an et par million d'habitants (Ladogana *et al.*, 2005 ; Holman *et al.*, 2010). Elles regroupent à elles seules 85 % des cas d'ESTs humaines (Head, 2013). En France, 95 patients ont été recensés en 2016 (InVS). Ce taux est plus élevé dans les pays européens au vu d'une surveillance épidémiologique accrue.

Les patients sont âgés en moyenne de 64 ans avec une distribution allant de 50 à 75 ans. Toutefois, un patient âgé de 20 ans a été rapporté (Murray *et al.*, 2008). L'évolution rapide progresse en deux à douze mois après l'apparition des premiers signes cliniques. Les patients présentent principalement une démence associée à un affaiblissement intellectuel, des troubles de la mémoire ainsi qu'une désorientation spatiotemporelle. Des perturbations des conduites sociales sont décrites liées notamment au mutisme du patient. Des troubles neurologiques sont également présents tels que des pertes d'équilibre, des troubles visuels (cécité corticale) ainsi que dans 90 % des cas des contractions musculaires (myoclonies).

L'origine de la forme sporadique de la MCJ n'est pas élucidée. L'une des hypothèses est qu'elle puisse apparaître suite à la génération spontanée de PrP anormale dans le cerveau (Prusiner, 1998). L'absence de facteur de risque identifié pour les autres formes de MCJ (contamination alimentaire, accident iatrogène ou la présence de mutation génétique) et la distribution géographique aléatoire du nombre de cas peuvent corroborer cette théorie. Toutefois, aucune étude n'a permis de mettre en évidence d'apparition spontanée de maladie à prions, en dehors des formes familiales.

3.2 Les formes génétiques

Les formes génétiques représentent environ 5 à 10 % des cas d'ESTs humaines recensés, soit huit à dix cas par an en France (neuf cas en 2016, InVS). Ce sont des maladies autosomiques dominantes pour lesquelles 40 mutations ont été décrites sur le gène *Prnp* codant pour la PrP physiologique (Kovács *et al.*, 2002 ; Beck *et al.*, 2010). Les symptômes et les lésions neuronales diffèrent en fonction des mutations génétiques (pour revue : Mastrianni, 2010). L'âge d'apparition de la maladie est précoce entre 34 et 54 ans, ce qui est en moyenne plus tôt que les autres ESTs humaines. Inversement, la phase clinique est généralement rallongée par rapport aux formes sporadiques (Liberski, 2012). La symptomatologie et l'analyse génétique peuvent permettre de poser un diagnostic du vivant du patient qui sera confirmé à l'examen microscopique du cerveau.

⁵ Les méthodes de diagnostic seront présentées ultérieurement (Pages 14 à 16).

L'**IFF** est caractérisée par une atteinte thalamique majeure. La mutation la plus fréquente est D178N (Montagna *et al.*, 2003). Les signes cliniques débutent généralement par des insomnies (pas nécessairement présentes), une perte de poids souvent associée à une perte d'appétit et une démence progressive. L'évolution fatale survient environ 14 mois après l'apparition des signes cliniques.

Contrairement aux autres ESTs, la spongiose est souvent absente et seules les lésions neuronales, gliose réactionnelle et atrophie thalamique, sont retrouvées. Récemment, un patient sporadique (sans mutation sur le gène *Prnp*) atteint d'IFF a été décrit (Scaravilli *et al.*, 2000). L'examen neuropathologique a révélé la présence de PrP anormale associée en *ante mortem* à des troubles du sommeil détectés par enregistrements polysomnographiques. Depuis une dizaine de cas ont été rapportés dans la littérature (Piao *et al.*, 2005 ; Hirose *et al.*, 2006 ; Capellari *et al.*, 2008).

Le **syndrome de GSS** a été décrit pour la première fois dans une famille autrichienne en 1928 (Liberski, 2012). La mutation la plus souvent retrouvée est P102L (substitution au codon 102 de la proline par la leucine). Le GSS débute par une ataxie cérébelleuse (Hsiao *et al.*, 1989) et peut être associé à des paraparésies spastiques ainsi que des troubles extrapyramidaux (Greenfield *et al.*, 2002). La progression de la maladie est lente et peut s'étendre d'un à 19 ans (Liberski, 2012). Histologiquement, ce syndrome est souvent associé à la présence de plaques amyloïdes multicentriques disséminées dans l'encéphale.

La **MCJ génétique** a été identifiée pour la première fois dans une famille polonaise (Goldgaber *et al.*, 1989). La mutation la plus fréquente (70% des cas) est causée par la substitution E200K. Elle présente des similarités cliniques, lésionnelles et biochimiques avec la forme sporadique de la MCJ (Gambetti *et al.*, 2003). Elle est caractérisée par une ataxie précoce et des myoclonies.

3.3 Les formes acquises

Les formes acquises regroupent le Kuru, les cas de contaminations iatrogènes et la vMCJ.

Le kuru

Les premiers cas dateraient de 1920 mais le Kuru a été officiellement décrit en 1957 par deux médecins, Vincent Zigas et Carleton Gajdusek. Confinée dans la tribu des Foré située en Papouasie-Nouvelle-Guinée, cette maladie n'a jamais été décrite dans d'autre pays, à l'exception des populations voisines suite à des mariages avec les Foré. Grâce à ses travaux épidémiologiques et ses résultats scientifiques majeurs, Gajdusek recevra en 1976 le prix Nobel de médecine pour ses découvertes concernant « de nouveaux mécanismes pour l'origine et la dissémination des maladies infectieuses ». De nos jours, cette maladie est éradiquée.

Classiquement différentes phases dans la survenue des symptômes du Kuru étaient observées (Simpson, Lander, et Robson, 1959 ; Zigas et Gajdusek 1959 ; ; Hornabrook, 1968). Un premier stade pendant lequel des tremblements étaient visibles sur l'ensemble du corps, rapidement suivis d'une perte d'équilibre obligeant l'individu à s'aider d'un bâton. Précisons, qu'en langage Foré, Kuru signifie « trembler » (de frayeur ou de froid) (Hornabrook, 1975). Une deuxième phase transitoire dite d'euphorie tranquille était caractérisée par des rires incontrôlés. Enfin, le tableau clinique se dégradait rapidement et le patient devenait incontinent, incapable d'articuler, de se déplacer et d'avalier.

Au plus fort du pic de contamination, cette maladie devenait épidémique avec la moitié des décès causés par le Kuru dans les villages les plus touchés. Au total 3 000 papous sont morts sur une population d'environ 30 000 individus.

Rapidement le lien épidémiologique entre les pratiques funéraires des papous et le Kuru a été fait. Cette population pratiquait de l'endocannibalisme, c'est-à-dire la consommation d'individus décédés en fonction des liens de parenté qu'ils entretenaient avec le défunt. L'ensemble du corps était mangé et la répartition des organes aux membres de la famille suivait des règles particulières, comme le rapporte l'article de Whitfield et ses collaborateurs (Whitfield *et al.*, 2008).

Ces rites funéraires avaient pour objectif initial de conserver l'âme du défunt au sein de la tribu. En 2007, le médecin australien Michael Alpers proposera d'appeler ce phénomène « transumption ». Ces pratiques étaient majoritairement réservées aux femmes et aux jeunes enfants (de trois à sept ans). Cela peut expliquer la répartition inégale des cas entre les hommes et les femmes : huit femmes touchées pour un homme et les 2/3 des cas totaux étaient des enfants. Dès la fin des années 1950, les autorités australiennes interdisent ces pratiques, et le nombre de cas diminua significativement jusqu'à la disparition de la maladie de nos jours (Gajdusek, 1973).

Les cas décrits plus tard sont attribués à des individus ayant participé aux pratiques funéraires au cours de leur enfance, et ayant eu une période d'incubation extrêmement longue de plus de 50 ans pour certains (Collinge *et al.*, 2006 ; Collinge *et al.*, 2008).

De façon équivalente au polymorphisme de susceptibilité retrouvé chez le mouton, il existe chez l'Homme un polymorphisme en position 129 (soit une méthionine, M, soit pour une valine, V) sur le gène codant pour la PrP. Dans la population caucasienne, 50% des individus sont hétérozygotes (MV), 40% sont méthionine homozygotes (MM) et 10% sont valine homozygotes (VV) (Brown *et al.*, 2012). Ce polymorphisme est considéré comme un facteur de susceptibilité important dans le développement et la durée d'incubation de la maladie (Mead *et al.*, 2003). En effet, les individus homozygotes MM présentent un risque accru par rapport aux VV et MV (Mead *et al.*, 2009). Les études rétrospectives mettent en évidence que les Foré ayant participé aux rites funéraires au cours de leur enfance et n'ayant pas développé de Kuru étaient non homozygotes MM sur le codon 129 (Asante *et al.*, 2015). Chez la souris, les expériences soulignent que la susceptibilité à développer une maladie à prions est, dans l'ordre : MM/ MV/ VV (Wadsworth *et al.*, 2001 ; Wadsworth *et al.*, 2004 ; Bishop *et al.*, 2006). Expérimentalement, le codon 129 est influencé par l'espèce et la voie d'exposition (Palmer *et al.*, 1991 ; Shibuya *et al.*, 1998).

Ainsi, ce polymorphisme n'est pas directement pathologique mais le codon MM est associé à une susceptibilité à développer rapidement une maladie. Dès 1959, soit deux ans après la description du Kuru, des ressemblances histologiques ont été observées avec la MCJ par le neuropathologiste Igor Klatzo (Klatzo, Gajdusek, et Zigas, 1959), puis avec la tremblante (Hadlow, 1959). L'hypothèse concernant l'origine du Kuru semble être la présence d'un cas spontané au sein de la tribu (Alpers et Rail, 1967 ; Liberski, Sikorska, et Brown, 2012). En 1966, la transmissibilité de l'agent du Kuru est mise en évidence grâce aux expériences de Gajdusek et son équipe sur les chimpanzés (Gajdusek, Gibbs, et Alpers, 1966). C'est la première maladie à prions humaine démontrée comme transmissible *in vivo*.

Les accidents iatrogènes

Les cas iatrogènes de MCJ ont été causés suite à l'exposition accidentelle d'extraits cérébraux contaminés : (i) directement lors d'injection d'hormones d'origine hypophysaire ou de transplantation de greffon contaminé (ii) indirectement via l'intermédiaire d'instruments lors d'opérations neurochirurgicales (implantation d'électrodes, aiguilles de repérage stéréotaxique). Dans les années 80, les troubles de croissances étaient traités par **injections intramusculaires ou sous-cutanées d'hormones de croissance extraites d'hypophyse humaine** récupérée sur des cadavres souvent âgés (Swerdlow *et al.*, 2003 ; Brown *et al.*, 2012).

Les traitements étaient réalisés sur des patients jeunes, ce qui explique que l'âge moyen de début de la maladie soit de 24 ans en France (Brandel *et al.*, 2003). Plus de la moitié des cas totaux sont répertoriés en France (Tableau 2). Dorénavant, les hormones sont produites artificiellement par biologie de synthèse (depuis 1985 en France). La majorité des cas iatrogènes sont MM au codon 129. Pourtant certains individus sont VV, et ont eu une durée de vie plus longue au regard des homozygotes MM (Huillard *et al.*, 1999).

D'autres hormones d'origine hypophysaires étaient utilisées dans le cadre de traitements visant à améliorer la fertilité. Ainsi, quatre cas de MCJ ont été recensés en Australie chez des femmes traitées par **injections d'hormones gonadotropes ou avec des glucocébrosidases placentaires**.

Les cas liés à des **greffes de cornées et de dure mère** sont plus rares en France, comme le présente le tableau 2, mais particulièrement fréquents au Japon. Le premier patient décrit date de 1974 suite à une greffe de cornée (Duffy *et al.*, 1974). En France, les greffes de dure-mère sont définitivement interdites depuis 1994, et remplacées par l'utilisation de produits synthétiques.

Les contaminations via des **instruments de neurochirurgie** sont plus anecdotiques en termes de cas cliniques recensés (Hachimi *et al.*, 1997). Ils font suite aux propriétés de résistance de l'agent face aux procédures de décontaminations classiquement utilisées dans le milieu hospitalier ainsi que sa forte hydrophobicité notamment pour l'acier chirurgical (Zobeley *et al.*, 1999 ; Flechsig *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Répartition du nombre de cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob suite à des accidents iatrogènes à l'échelle nationale et internationale.

	En France	Total
Greffe de tissu ¹	14	228
Hormones d'origine hypophysaire ²	119	243
Instruments contaminés de neurochirurgie/ stéréotaxie	0	7

¹Regroupant les greffes de cornées et de dure-mère
²Comprenant les hormones de croissances extractives et gonadotropes

Plus récemment trois cas de **contaminations par transfusions sanguines** dans le cadre de la vMCJ ont été décrits au RU, et feront l'objet d'un chapitre entier⁶.

⁶ Deuxième partie : Évaluation et prévention du risque prion en termes de santé publique (pages 46 à 66).

3.4 La variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

Dès 1990, un réseau de surveillance des MCJ (*The national CJD Surveillance Unit, NCJDSU*) a été mis en place au RU, puis harmonisé au sein de l'Union Européenne (UE) (Will *et al.*, 1998). Grâce à lui, dix cas présentant des caractéristiques particulières, ont été recensés en 1994 comme le rapporte Will et ses collaborateurs (Will *et al.*, 1996). Contrairement aux autres ESTs humaines, les patients étaient jeunes, moins de 30 ans (95% des patients été âgés de 28 ans), sans pour autant que des mutations génétiques n'aient pu être mises en évidence. La phase clinique est prolongée à environ 16 mois alors qu'elle est d'ordinaire de quatre mois (Valleron *et al.*, 2001). La symptomatologie se distingue également en débutant par des atteintes psychiatriques prononcées associées à des phases de dépression et d'hallucinations, suivies de troubles neurologiques.

Ces différents critères ont conduit à qualifier cette nouvelle forme, de nouveau variant de la MCJ (nvMCJ), dorénavant appelée variante de la MCJ, vMCJ (Will *et al.*, 1996). Dans la suite du manuscrit, l'abréviation vMCJ sera utilisée.

À ce jour, 228 cas ont été répertoriés dans le monde (exclusion des trois cas post-transfusionnel⁷). Depuis les années 2000, l'incidence annuelle décline fortement (Figure 2).

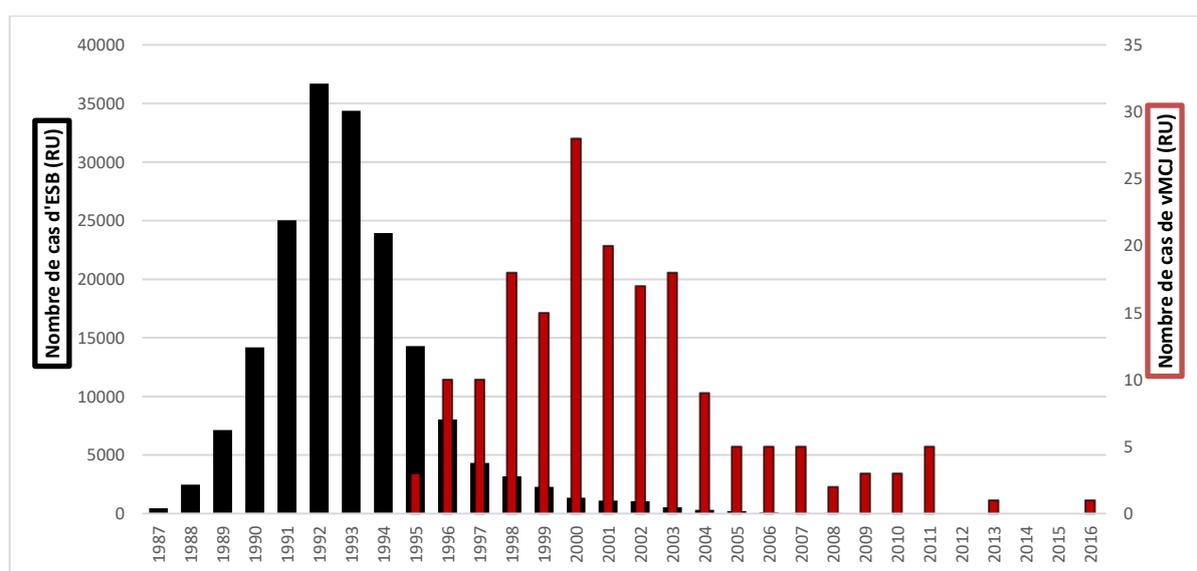


Figure 2 : Nombre de cas d'ESB et de vMCJ au Royaume-Uni (RU) sur la période 1987-2016.

D'après les données de l'OIE pour le nombre d'Encephalopathie Spongiforme Bovine (ESB, histogramme de couleur noire, incluant uniquement les formes classiques), et d'après le site cjd.ed.ac.uk pour le nombre d'individus atteints de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ, incluant les trois cas de contamination post-tranfusionnel, histogramme de couleur rouge).

Très rapidement, les études épidémiologiques ont suggéré un lien entre l'épidémie de l'ESB et l'apparition des cas de vMCJ (Figure 2) confirmé ensuite par une série d'expériences.

Dès 1996, des transmissions expérimentales chez le macaque cynomolgus révèlent la présence de plaques florides dans leur cerveau identique à celles décrites chez les patients atteints de vMCJ (Lasmézas *et al.*, 1996, Figure 3). Ces atteintes neuropathologiques caractéristiques de la vMCJ sont composées au centre d'agrégats de PrP anormale, entourés d'une couronne de vacuoles.

⁷ Deuxième partie : Évaluation et prévention du risque prion en termes de santé publique (pages 46 à 66).

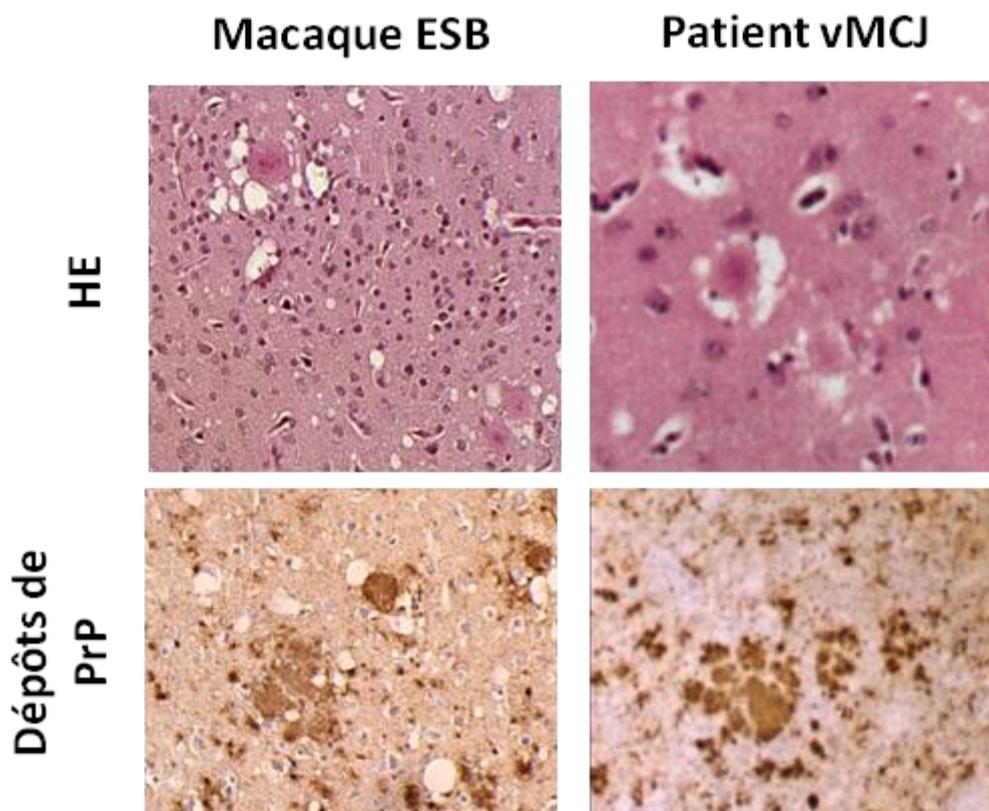


Figure 3 : Similitudes lésionnelles entre un cerveau de macaque inoculé avec l'agent de l'ESB et celui d'un patient atteint de vMCJ (d'après Lasmézas *et al.*, 1996).

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine ; HE : Hématoxyline éosine ; PrP : Protéine prion ; vMCJ : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

De même, des signes cliniques et des lésions identiques ont été retrouvés dans des modèles murins (Bruce *et al.*, 1997). Enfin, le typage moléculaire des deux souches révélera les mêmes profils électrophorétiques (Hill, Desbruslais, *et al.*, 1997).

Ces données mettent en avant que l'agent responsable de l'ESB a réussi à franchir la barrière d'espèce bovin-Homme et à induire une maladie mortelle chez l'Homme.

C'est ainsi, que le ministre de la santé britannique, Stephen Dorrell, annoncera officiellement le 20 mars 1996 l'apparition des premiers cas humains causés suite à l'ingestion de viande bovine contaminée. En plus d'une crise économique (éradication des foyers infectieux, image négative de la production bovine associée à un effondrement de la consommation de viande), cet épisode marque une véritable perte de confiance de la population envers les autorités car contrairement à ce qui avait été annoncé : l'ESB présente bel et bien un risque en termes de santé publique.

3.5 Les méthodes de diagnostic *ante mortem*

Le diagnostic de certitude d'une MCJ est posé à la mort du patient lors de l'examen neuropathologique. Ce dernier permet de mettre en évidence dans le tissu cérébral : la spongiose, des dépôts anormaux de PrP en IHC associés à un profil biochimique particulier (Collinge *et al.*, 1996 ; Zeidler *et al.*, 2000).

Du vivant du patient, le diagnostic est difficile à établir car les troubles cognitifs sont peu spécifiques, notamment au début de la phase clinique, et peuvent ressembler à d'autres démences comme celles observées dans la maladie d'Alzheimer ou la démence à corps de Lewy.

Certains examens présentés dans le tableau 3 permettent d’orienter le diagnostic (Hsich *et al.*, 1996 ; Zerr *et al.*, 2009 ; Collins *et al.*, 2006) : (i) l’électroencéphalogramme, EEG (Court et Bert 1995 ; Hansen *et al.*, 1998) (ii) l’imagerie par résonance magnétique cérébrale, IRM (Schröter *et al.*, 2000 ; Vitali *et al.*, 2011) ou (iii) l’analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR)⁸ (Hsich *et al.*, 1996 ; Zerr *et al.*, 2009). Ces techniques n’ayant pas une sensibilité de 100%, l’absence d’anomalie ne permet pas d’éliminer le diagnostic de maladie à prions. En parallèle, le médecin recherche la présence de facteurs de risque d’une MCJ : expositions iatrogènes potentielles, antécédents familiaux de MCJ. Face à l’absence de traitement efficace, la prise en charge du patient est, à ce jour, essentiellement symptomatologique.

Tableau 3 : Principales méthodes de diagnostic des maladies à prions humaines (d’après www.creutzfeldt-jakob.aphp.fr).

	Formes génétiques ¹	Forme sporadique de la MCJ	La variante de la MCJ
Techniques directes de détection	Étude du gène <i>Prnp</i> ²	Anomalies sur le gène <i>Prnp</i>	-
	Biopsie d’amygdale pharyngée ³	-	Détection de PrP anormale
Techniques indirectes de détection	IRM	<i>Selon la mutation</i>	Hypersignaux caractéristiques (« signe du pulvinar »)
	EEG	<i>Selon la mutation</i>	Anomalies typiques dans ≈ 60% des cas
	Recherche de la protéine 14-3-3 dans le LCR	<i>Selon la mutation</i>	Détection positive (80% des cas)

¹Les formes génétiques regroupent le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l’insomnie fatale familiale (IFF) et les formes génétiques de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

²L’étude génétique est obligatoirement soumise au consentement du patient.

³La biopsie d’amygdale n’est utile que pour le diagnostic de vMCJ. Cet acte invasif est de moins en moins pratiqué. En France, il n’est demandé qu’en cas de forme atypique du sujet jeune sans argument neuroradiologique en faveur d’une vMCJ. La protéine prion (PrP) anormale est recherchée par des techniques histologiques et biochimiques.

En cas de suspicion de MCJ et après élimination d’autres affections, une ponction lombaire est réalisée en vue d’analyser le LCR et de mettre en évidence la présence d’une protéine ubiquitaire, la protéine 14-3-3 (Zerr *et al.*, 1998 ; Hamlin *et al.*, 2012). Cette dernière est abondamment présente en condition physiologique dans le cerveau, notamment dans les neurones et les cellules gliales. Lors d’une souffrance cellulaire importante, elle est libérée dans le LCR (Shimada *et al.*, 2013). Ainsi des patients atteints de démences neurodégénératives peuvent présenter une détection positive (Hsich *et al.*, 1996). Les autres causes de faux positifs sont nombreuses (accident vasculaire cérébral, AVC récent, épilepsie, encéphalites infectieuses...) (Peckeu *et al.*, Eurosurveillance 2017). Par conséquent, les résultats obtenus doivent être interprétés en fonction des autres examens complémentaires.

⁸ Les avancées majeures concernant les techniques d’amplification de l’agent dans le LCR seront détaillées ultérieurement (Pages 68 à 69).

Certaines formes atypiques de maladie d'Alzheimer restent difficiles à distinguer de la MCJ. L'équipe d'Armand Perret-Liaudet à Lyon a proposé d'analyser en plus de la protéine 14-3-3, la PrP totale directement dans le LCR (Dorey *et al.*, 2015). En 2015, ils ont mis en évidence une diminution de la PrP totale chez les patients MCJ en comparaison des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Dorey *et al.*, 2015).

Concernant les formes sporadiques, la présence d'anomalies typiques sur l'électro-encéphalogramme, EEG est fréquemment décrite (Court et Bert 1995 ; Hansen *et al.*, 1998). De plus, dans près de 80% des cas des hypersignaux dans le striatum (noyau caudé ou putamen) et/ou le cortex sont visualisables en IRM d'autant plus qu'une imagerie de diffusion est réalisée (Schröter *et al.*, 2000 ; Vitali *et al.*, 2011). L'avènement des méthodes d'amplification comme la RT-QuIC dans le LCR a constitué un progrès indéniable. En effet, cette technique présente, selon la génération du test utilisée, une sensibilité entre 80 et 90% pour le diagnostic de la MCJ sporadique et une excellente spécificité dépassant 95%. Les résultats de la RT-QuIC ont été ajoutés dans les critères européens du diagnostic de la MCJ sporadique en janvier 2017.

Contrairement aux formes sporadiques, des dépôts anormaux de PrP sont classiquement retrouvés dans les organes lymphoïdes des patients atteints de vMCJ (Ironsides et Head, 2004). Bien que non pratiqué en routine comme technique de diagnostic, la **biopsie d'amygdale permet** une détection *ante-mortem* directe de la PrP anormale (Hill, Zeidler, *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 1999 ; Wadsworth *et al.*, 2001 ; Hilton *et al.*, 2004). La distribution périphérique de l'agent infectieux pose actuellement des difficultés en termes de santé publique notamment lors des transfusions sanguines. En parallèle, les images par IRM mettent en évidence **la présence d'un signe du pulvinar** (noyau le plus postérieur du thalamus) bilatéral non décrit dans les formes sporadiques (Haïk *et al.*, 2002). La biopsie cérébrale permet de mettre en œuvre des techniques de détection directe mais, compte tenu de son caractère invasif, elle n'est plus qu'exceptionnellement réalisée dans le cadre d'un diagnostic *ante-mortem*.

3.6 Les autres formes de maladies à prions humaines

Récemment de nouvelles formes de maladie à prions humaines ont été décrites.

Prionopathie à sensibilité variable à la protéolyse

En 2008, l'équipe de Gambetti identifie 11 patients atteints par une nouvelle forme de maladie à prions, initialement nommée Prionopathie Sensible à la Protéolyse traduit de l'anglais *Protease-Sensitive Prionopathy* (Gambetti *et al.*, 2008). Les premiers cas décrits sont tous homozygotes pour la valine au codon 129 (VV). Contrairement aux autres maladies à prions, cette encéphalopathie spongiforme est caractérisée par une faible résistance à la protéolyse par la protéinase K. Deux ans plus tard, la même équipe décrit 15 autres cas incluant des patients MM et MV au codon 129 (Zou *et al.*, 2010). Ces nouveaux cas présentent une plus faible résistance à la protéolyse, ce qui conduit Gambetti et son équipe à renommer cette maladie en Prionopathie à Sensibilité Variable à la Protéolyse, VPSPr, de l'anglais *Variably Protease-Sensitive Prionopathy* (Zou *et al.*, 2010). L'analyse en WB révèle une forte similitude de l'agent avec le profil électrophorétique retrouvé dans le GSS : Gambetti et son équipe proposeront que la VPSPr soit une forme sporadique du GSS (Zou *et al.*, 2010). En parallèle, d'autres cas ont été décrits par différentes équipes (Head *et al.*, 2009 ; Head *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2010 ; Head, 2013). À ce jour, aucune mutation du gène *Prnp* n'a été identifiée.

Chapitre I : Les maladies à prions

Les patients présentent des changements de comportements, des signes psychiatriques, des troubles de la parole et des atteintes cognitives. Par rapport aux formes sporadiques de MCJ et à la vMCJ, le diagnostic est difficile à établir car on assiste à une absence d'anomalie détectable à l'EEG, à l'IRM et suite à l'analyse du LCR.

Face à l'absence des critères classiquement retrouvés dans les maladies à prions, Gambetti et son équipe souligneront la possibilité que la VPSPr ne soit pas correctement diagnostiquée. Toutefois, l'injection de l'agent de la VPSPr à des souris humanisées n'induit pas une maladie chez l'animal, ce qui souligne un faible risque en termes de santé publique (Diack *et al.*, 2014).

De nouvelles formes familiales de maladie à prions

En 2013, une nouvelle forme familiale de maladie à prions a été décrite dans une famille britannique (Mead *et al.*, 2013). Au total, six membres présentent une mutation Y163X sur le gène *Prnp* conduisant à l'expression d'une PrP tronquée. Les patients présentent une neuropathie du système autonome se traduisant par des diarrhées chroniques. Ces signes cliniques, reflétant l'atteinte du système nerveux périphérique, apparaissent avant même ceux liés à une atteinte centrale. En 2014, un autre cas est identifié : un homme présentant la même mutation avec des troubles urinaires (infection, incontinence et douleur) associés à de fortes diarrhées (Themistocleous *et al.*, 2014).

Très récemment, une nouvelle mutation a été mise en évidence chez une femme présentant des troubles de la mémoire sémantique (Kenny *et al.*, 2017).

Il existe un large panel d'EST touchant différentes espèces de mammifères allant des souris à l'Homme, en passant par les ovins et les bovins. Malgré cette diversité, elles partagent des caractéristiques communes tant au niveau de la symptomatologie que des lésions associées. Qu'elles touchent l'Homme ou l'animal, les atteintes lésionnelles sont restreintes au SNC et sont plus ou moins prononcées en fonction des différentes régions cérébrales. Ces altérations cérébrales sont caractérisées par une spongiose concomitante à la présence de PrP anormalement conformée. Bien que certaines de ces maladies soient connues depuis des années notamment pour la tremblante des petits ruminants (milieu du XVIII^{ème} siècle), les nouvelles techniques de détection révèlent encore aujourd'hui de nouvelles formes de maladies à prions.

Chapitre II : La protéine prion

La nature de l'agent responsable des ESTs a longtemps été un sujet de controverses dans la communauté scientifique laissant place à des rivalités opposant l'hypothèse virale à celle du concept Prion. Les caractéristiques biochimiques particulières de l'agent ont conduit les scientifiques à le qualifier sous le terme « Agent Transmissible Non Conventionnel », ATNC, en opposition aux agents classiques : bactéries, virus, parasites et moisissures (Alper *et al.*, 1967 ; Griffith, 1967).

1- Historique de la découverte du Prion

Différentes hypothèses ont été formulées concernant l'origine de la tremblante comme par exemple une atteinte parasitaire par *Sarcosporidia* (M'Gowan, 1918). Néanmoins, le **caractère transmissible** de l'agent a conduit les scientifiques à s'orienter vers une hypothèse virale, et à proposer par exemple le virus de l'herpès comme agent causal de la tremblante (Weber, 1971). Face au **tableau clinique** particulier des ESTs à savoir une longue période d'incubation avec une détérioration rapide de l'état de santé ainsi qu'une absence de réponse immunitaire détectable (Chandler, 1959 ; Clarke et Haig, 1966 ; Gibbs et Gajdusek, 1970), le vétérinaire islandais Bjorn Sigurdsson travaillant sur la tremblante emploiera pour la première fois le terme de « virus lent » (Sigurdson, 1954 ; Sigurdson *et al.*, 1957).

Pourtant la **taille de l'agent** pose de grandes interrogations au sein de la communauté scientifique. Elle apparaît comme trop petite pour être compatible avec l'hypothèse virale (Alper *et al.*, 1966 ; Gibbs et Gajdusek, 1970). De plus, l'agent est uniquement détectable en microscopie électronique sous forme de structures fibrillaires associées à l'infectivité, SAF en anglais *Scrapie Associated Fibrils* (Merz *et al.*, 1981). Grâce à l'optimisation des techniques, le diamètre des particules contenues dans les fractions infectieuses a ensuite été estimé à 30 nm (Sklaviadis, Dreyer et Manuelidis, 1992).

D'autres études viennent mettre en avant le caractère exceptionnel de cet agent avec ses **propriétés de résistance** aux procédés de stérilisation tels que la résistance à l'autoclavage classiquement utilisée à 121°C pendant 20 minutes (Dickinson et Taylor, 1978), à la chaleur (Hunter et Millson 1964), ainsi qu'aux ultra-violets, UVs (Haig *et al.*, 1969). En 1966, les travaux de la radiobiologiste londonienne Tikvah Alper mettent en évidence la résistance de l'agent aux radiations ionisantes avec des longueurs d'onde de 254 nm, habituellement efficaces pour détruire les virus (Alper *et al.*, 1966). Le docteur Alper est partie du postulat que si l'agent responsable de la tremblante était un virus, il serait inactivé grâce aux UVs et rayons X.

Pourtant sa conclusion est toute autre : elle souligne l'incompatibilité entre une origine virale et l'absence d'acide nucléique (Alper *et al.*, 1966). Ces travaux seront confirmés par d'autres équipes (Latarjet *et al.*, 1970 ; Gibbs *et al.*, 1978). La contre-hypothèse est que ce virus possède des propriétés qui le rend résistant aux irradiations et/ ou qu'il possède un système de réparation cellulaire très efficace. Gajdusek qualifiera ainsi l'agent causal de « virus non conventionnel ». La théorie du « virino », c'est-à-dire un virus couplé à des protéines de l'hôte, sera également proposée. Cette hypothèse offre l'avantage d'expliquer l'extrême résistance de l'agent aux procédés d'inactivations classiques ainsi que l'absence de réaction immunitaire.

Dès 1967, le mathématicien londonien John Griffith propose que l'agent causal soit composé de protéines (Griffith, 1967). Cette hypothèse sera reprise la même année par Pattison et Jones (Pattison et Jones, 1967). L'utilisation de procédés physico-chimiques visant à dénaturer les protéines permettra de diminuer notablement l'infectiosité et confortera cette hypothèse (Latarjet et al., 1970 ; Prusiner et al., 1981). En 1982, le neurologue américain Stanley Prusiner reprendra ces différentes observations scientifiques et proposera que l'agent infectieux soit uniquement composé de protéine. Il le nommera **PRION pour l'anagramme « PROteinaceous INFECTIOUS particle »** (Prusiner, 1982). Prusiner défendra ardemment sa théorie face à un grand scepticisme ambiant. Le prix Nobel de médecine lui sera décerné en 1997 pour sa découverte « sur les Prions – un nouveau principe d'infection biologique ».

En 1984, Prusiner et ses collaborateurs, mettront en évidence qu'un **traitement par des protéases** conduit à la détection d'une fraction résistante de protéine prion qu'ils nommeront PrP 27-30, aujourd'hui qualifiée de PrP^{res}, pour résistante (Prusiner et al., 1984). Les travaux d'Oesch et ses collaborateurs ont permis de détecter le gène *Prnp* chez l'Homme codant pour la forme physiologique de la PrP (Oesch et al., 1985). En présence de détergents, elle est soluble et mise en évidence à un poids moléculaire compris entre 30 et 35 KDa, ce qui explique son appellation initiale de PrP 30-35, puis requalifiée de PrP^C, « C » pour cellulaire (Oesch et al., 1985 ; Meyer et al., 1986). De plus, les expériences d'hybridations *in situ* réalisées par Chesebro et ses collaborateurs révéleront que le niveau d'expression des ARN de la PrP est identique dans des individus sains et infectés (Chesebro et al., 1985). Ainsi, la protéine n'est pas codée par un génome exogène, et l'hypothèse virale ne tient plus.

Depuis plusieurs expériences ont permis de confirmer la théorie Prion.

La première d'entre elle a été la démonstration de l'importance de la PrP^C suite à **la génération de souris délétées pour le gène *Prnp*, notées PrPKo**, (de l'anglais *Knock out*) (Büeler et al., 1992 ; Manson et al., 1994a ; Mallucci et al., 2003). Ce modèle est totalement résistant à l'infection Prion (absence de signe clinique et de lésion neuropathologique caractéristique) quelle que soit la voie d'inoculation (Büeler et al., 1992 ; Manson et al., 1994). Ainsi, la PrP^C est requise pour le développement d'une maladie à prion.

En parallèle, suite à **l'inoculation de PrP recombinante, PrP^{rec}**, produite *in vitro* dans la bactérie *Escherichia coli*, les souris développent une maladie avec des lésions neuropathologiques classiquement décrites dans les ESTs (Legname et al., 2004 ; Colby et al., 2010 ; Wang et al., 2010 ; Makarava et al., 2011). Cette production de Prions synthétiques en absence de cofacteurs va dans le sens que la forme anormale de la PrP est capable à elle seule d'induire une maladie à prion.

Suite au développement des techniques d'amplification *in vitro*, **l'utilisation de la PMCA**, de l'anglais « *Protein Misfolding Cyclic Amplification* » (Saborio, Permanne, et Soto 2001), a permis de confirmer le concept Prion. Cette technique permet de mimer *in vitro* la conversion de la PrP^C en PrP^{res}. La forme pathologique ainsi générée possède les signatures biochimiques classiques et est infectieuse c'est-à-dire capable d'induire une maladie à prion suite à son inoculation dans des modèles murins (Castilla, Saá, et Soto 2005). En 2010, les travaux de Kim et ses collaborateurs iront plus loin en mettant en évidence le développement d'une maladie à prion chez le hamster suite à l'inoculation de PrP anormale générée par PMCA en utilisant de faibles dilutions (Kim et al., 2010).

Ainsi, la forme pathologique de la PrP correspond à une protéine mal conformée, infectieuse, et est capable de :

- Se **répliquer à partir de la protéine physiologique** : cette dernière joue donc un rôle primordial de substrat biologique pour générer une isoforme anormale ;
- **S'auto-propager** dans un organisme sain de cellule en cellule ;
- Présenter de **nouvelles caractéristiques biochimiques** : tendance à l'agrégation, insolubilité.

Toutefois, il persiste actuellement des controverses, et différentes études viennent infirmer l'hypothèse prion comme agent causal des ESTs. Selon la neuropathologiste Laura Manuelidis, travaillant à l'Université de Yale aux États-Unis, la théorie du « virino » tient toujours (Manuelidis 2007 ; Manuelidis, Liu, et Mullins, 2009), comme le précisait des études plus anciennes (Weissman, 1962 ; Kimberlin, 1982 ; Ozel *et al.*, 1994). Elle précise que les virus remplissent toutes les caractéristiques de l'agent précédemment décrites : résistance à long terme dans l'environnement, petite taille (environ 25 nm). De plus, l'hypothèse virale permettrait d'expliquer le large panel d'espèces touchées et les différentes signatures biochimiques retrouvées. Des expériences *in vivo* soulignent le développement d'une maladie associée aux lésions neuropathologiques classiquement décrites dans les ESTs suite à l'inoculation d'un rétrovirus (Manuelidis *et al.*, 2007). Certains auteurs précisent la nécessité d'avoir des cofacteurs tels que l'héparine (Supattapone, 2004) ou encore des partenaires tels que de l'ARN étrangers au génome de l'hôte (Deleault, Lucassen, et Supattapone 2003 ; Byron Caughey et Baron, 2006 ; Simoneau *et al.*, 2015 ; Annus, Csáti, et Vécsei, 2016) pour générer de l'infectiosité.

Dans la majorité des ESTs humaines et animales, des accumulations de PrP anormales sont retrouvées et restent à ce jour la seule modification spécifiquement détectable. Les théories virales sont compatibles avec le concept Prion si on admet la possibilité qu'il puisse être couplé à d'autres éléments. L'agent causal peut donc être uniquement composé de PrP anormale ou simplement l'un des composants.

2- La protéine prion physiologique

Il est de plus en plus admis par la communauté scientifique que les ESTs soient causées par la transconformation de la PrP physiologique de l'hôte en son isoforme pathologique.

Pour bien comprendre ce processus, la structure et les fonctions de la PrP^C seront rappelées.

2.1 Structure, métabolisme et trafic de la protéine

Une protéine constitutive

La PrP^C est codée par le gène *Prnp* situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme et sur le chromosome 2 chez la souris (Sparkes *et al.*, 1986). Le promoteur de ce gène présente les caractéristiques des gènes dits « de ménage », traduit de l'anglais *housekeeping genes* (Basler *et al.*, 1986 ; Puckett *et al.*, 1991) : le gène *Prnp* est donc considéré comme un gène constitutif. Il est constitué de trois exons chez la souris, la vache et le mouton et deux chez le hamster et l'Homme.

La PrP^C est fortement conservée au cours de l'évolution et est présente chez tous les mammifères (Chesebro *et al.*, 1985 ; Oesch *et al.*, 1985 ; Basler *et al.*, 1986). Une forte homologie en amino-acides (environ 80%) entre les séquences des amphibiens et des mammifères est observée (Oesch, Westaway, et Prusiner, 1991 ; pour revue Grassmann *et al.*, 2013) tandis qu'une plus grande disparité est retrouvée entre les mammifères et les oiseaux (Wopfner *et al.*, 1999). Au sein des primates cette homologie s'échelonne entre 92,9 à 99,6% (Schätzl *et al.*, 1995).

Une expression différentielle du gène *Prnp*, non comprise à ce jour, est observée selon les tissus et les types cellulaires. Le plus fort niveau d'expression de la PrP^C est retrouvé dans le SNC, notamment dans les neurones (Kretzschmar *et al.*, 1986) et plus faiblement dans les cellules gliales (Follet *et al.*, 2002).

Structure native et tridimensionnelle de la PrP^C

La PrP^C est une sialoglycoprotéine, c'est-à-dire une glycoprotéine contenant de l'acide sialique. La forme native c'est-à-dire néo-synthétisée est initialement formée d'au minimum 250 acides aminés (aa), variable selon les espèces : 253 aa chez l'Homme, 254 aa chez la souris et le hamster, 256 aa chez le mouton et 269 aa chez la vache. La plus grande hétérogénéité entre les différentes espèces réside au niveau du peptide signal NH₂ terminal (Nter). Comme décrit sur la figure 4, la PrP^C est composée de plusieurs domaines distincts.

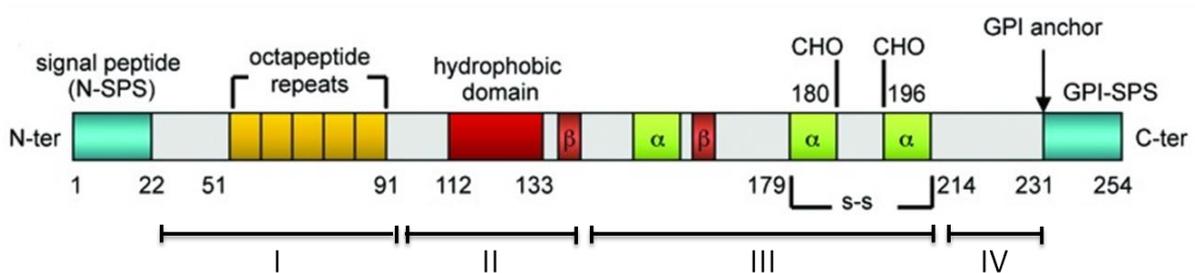


Figure 4 : Représentation schématique de la PrP^C murine (d'après Petit *et al.*, 2013).

La partie N-terminale (N-ter) comprend un peptide signal de 22 acides aminés qui sera éliminé afin de permettre la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. La région I est composée de répétitions d'octapeptides (23-91). La région II (92-135) est composée notamment de la région hydrophobe de 110 à 135. La région III (136 – 213) est composée d'alternance entre les parties hydrophobes et hydrophiles. La région IV (214 – 231) est composée de deux sites de N-glycosylation (CHO) aux positions 180 et 196. La séquence C-terminale (C-ter) est la zone hydrophobe qui sera remplacée par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).

La structure tridimensionnelle (3D) de la PrP^C a été obtenue pour la première fois à partir de PrP recombinante de souris par résonance magnétique nucléaire (RMN) : elle est composée de trois hélices alpha et de deux feuillets bêta anti-parallèle (Riek *et al.*, 1996). Sa structure 3D a ensuite été confirmée chez d'autres espèces telles que le hamster (James *et al.*, 1997 ; Donne *et al.*, 1997) et chez l'Homme (Zahn *et al.*, 2000, figure 5). Actuellement aucune étude n'a permis de déterminer la structure 3D exacte de la PrP^C à cause de contraintes techniques (degré de pureté protéique, concentration protéique insuffisante) ni celle de son isoforme pathologique compte tenu de la forte composition en feuillet β (Riesner, 2003).

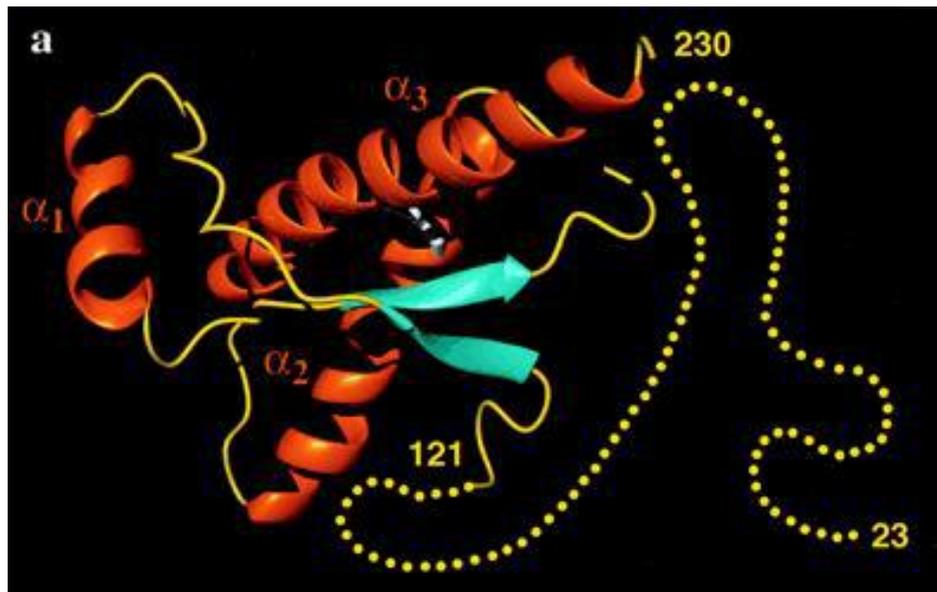


Figure 5 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine prion cellulaire recombinante humaine (Zahn *et al.*, 2000).

Cette représentation a été obtenue par résonance magnétique nucléaire. Les trois hélices alpha sont représentées en rouge, les feuillets bêta en turquoise, les régions du domaine C-terminale en jaune et les régions flexibles du domaine N-terminale en pointillé jaune.

Biosynthèse, maturation et dégradation

La synthèse et la translocation de la PrP^C suivent le processus d'anabolisme classique pour les protéines solubles et sécrétées, à savoir une synthèse dans le réticulum endoplasmique (RE), une maturation dans l'appareil de Golgi et une migration à la surface cellulaire.

Des **modifications post-traductionnelles vont avoir lieu dans le RE**, siège de la synthèse protéique. Une première étape consiste en l'élimination du peptide signal Nter de 22 aa. Cette étape va permettre l'adressage de la protéine à la face externe de la membrane, en d'autres termes sa translocation à travers le RE pour aller dans l'appareil de Golgi puis à la membrane. L'extrémité carboxy-terminale ou C-terminale (C-ter) de 23 aa va être éliminée et remplacée par l'ajout de l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). À l'issue de ces modifications post-traductionnelles, la PrP^C mature sera composée de 208 aa chez l'Homme et la souris (Riek *et al.*, 1997 ; Puig *et al.*, 2011). **La PrP^C va ensuite progresser dans l'appareil de Golgi**, lieu de maturation protéique avant son adressage à la membrane plasmique. Elle va subir différents clivages avant de devenir complètement mature. Un pont disulfure va être ajouté entre les cystéines 179 et 214 (PrP^C murine) de la région Cter afin de stabiliser la structure en liant les hélices entre elles (Turk *et al.*, 1988). Deux sites de glycosylation sont possibles sur les asparagines Asn 180 et 196 (PrP^C murine) d'où la présence de trois glycoformes : non glycosylé (27 kDa), mono- (26 à 30 kDa) et di-glycosylé (33 à 35 kDa). Ainsi, ces différents degrés de glycosylations expliquent la variabilité des poids moléculaires distinguables en WB (de 30 à 35 kDa). La glycosylation permet de modifier le transport de la protéine ainsi que sa durée de vie.

La PrP^C sera ensuite adressée à la membrane plasmique où elle pourra s'attacher sur la face externe de la membrane cellulaire grâce à son ancre GPI (Stahl *et al.*, 1987). À ce stade, la PrP^C peut être libérée, selon trois clivages protéolytiques endogènes, dans le milieu extracellulaire (pour revue Mangé et Lehmann, 2002 ; Altmeyen *et al.*, 2013), ce qui explique la variation au cours du temps de son expression détectée à la surface des cellules.

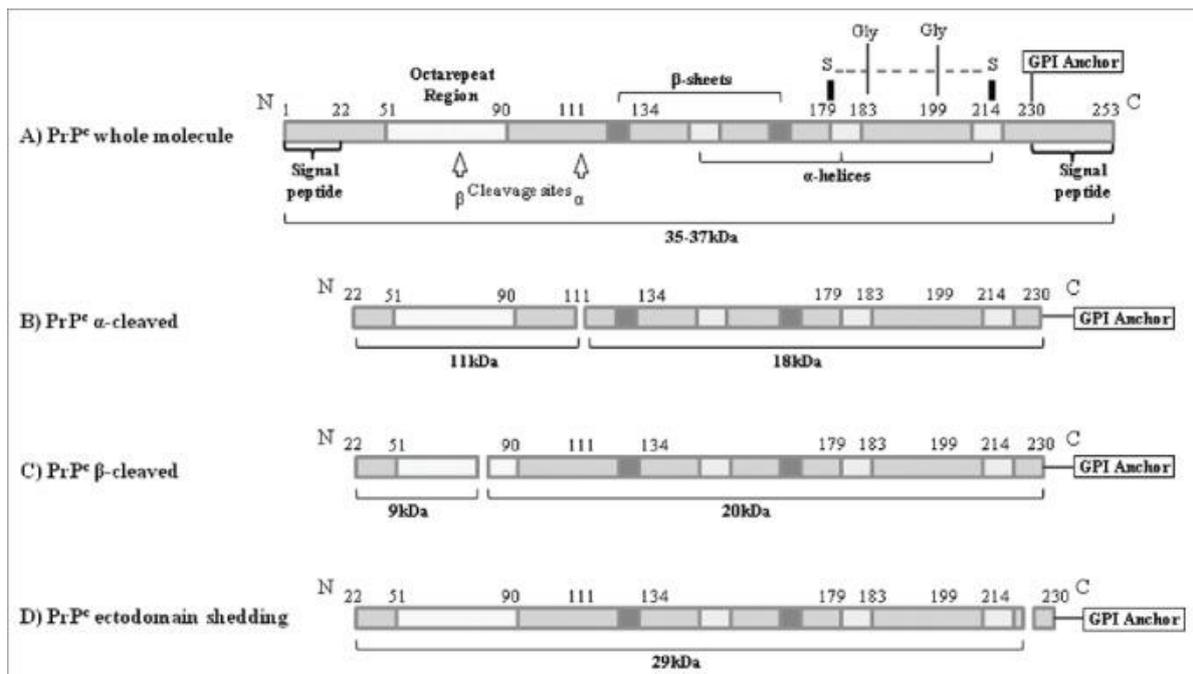


Figure 6 : Représentation des trois clivages protéolytiques de la PrP^C (Atkinson *et al.*, 2016).

A) Représentation schématique de l'ensemble de la protéine prion cellulaire (PrP^C). B) Clivage alpha (position 110 – 111) : relargage dans le milieu extracellulaire du fragment NH₂-terminal, N1, tandis que le fragment carboxy-terminal, C1, reste ancré à la membrane. C) Clivage bêta (position 90 – 91) : relargage du fragment N2, et C2 reste ancré à la membrane. D) Libération de la PrP^C entière : phénomène de *shedding*.

Un clivage au niveau de l'ancre GPI peut avoir lieu et ainsi libérer entièrement la PrP^C : on parle alors de la forme entière ou *full length* en anglais (Borchelt *et al.*, 1993). Ce phénomène de libération de la protéine est appelé *shedding*.

Le clivage alpha constitutif a lieu en position 110 – 111 pour la PrP^C humaine (Chen *et al.*, 1995 ; Vincent *et al.*, 2000 ; Watt *et al.*, 2005). Il va entraîner la libération du fragment Nter appelé N1, tandis que le fragment carboxyl, C1, reste accroché à la membrane (Chen *et al.*, 1995 ; Mangé *et al.*, 2004). Le fragment C1 est principalement retrouvé chez les individus sains (Yadavalli *et al.*, 2004). Ce clivage physiologique semble être régulé directement ou indirectement par la famille des enzymes protéolytiques appelées ADAM (*alpha disintegrin and metalloprotease*), notamment ADAM8 et 17 (Ironsides *et al.*, 2006 ; Vincent *et al.*, 2001 ; Liang et Kong, 2012). Certaines études ne retiennent pas cette hypothèse (Béland *et al.*, 2012 ; Wik *et al.*, 2012).

Le clivage bêta est décrit lors de l'infection par la PrP anormale. Un clivage en position 90 - 91 (au niveau des octapeptides) génère deux fragments notés N2 et C2 (Chen *et al.*, 1995). Ce processus est retrouvé en présence de stress oxydatif (Watt *et al.*, 2005b ; Walmsley *et al.*, 2009).

La PrP^C est ensuite internalisée par endocytose pour être soit recyclée soit dégradée dans les lysosomes par les protéases. La sensibilité de la PrP^C à la dégradation des protéases conduit à un temps de demi-vie court. Des expériences réalisées *in vitro* révèlent qu'elle est synthétisée en environ trois heures et éliminée en six à douze heures (Caughey *et al.*, 1989 ; Borchelt *et al.*, 1990).

2.2 Analogues structuraux de la PrP^C

Deux analogues structuraux de la PrP^C sont connus à ce jour : **Doppel** (Dpl) et **Shadoo** (Figure 7, pour revue Watts et Westaway, 2007 ; Ciric et Rezaei, 2015).

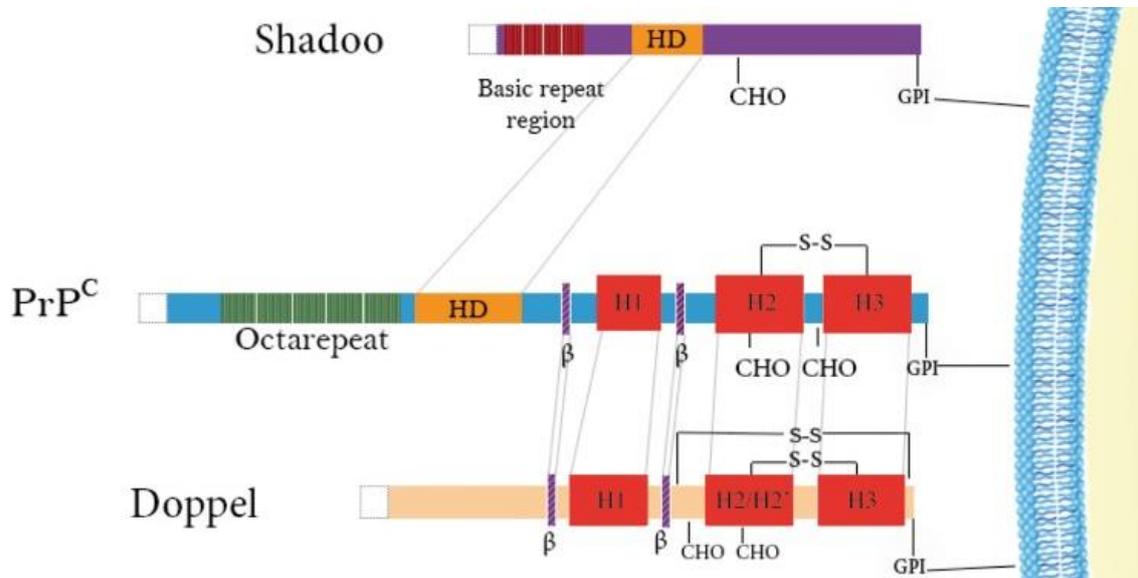


Figure 7 : Structure de la protéine prion cellulaire et de ses analogues structuraux, Doppel et Shadoo (Ciric et Rezaei, 2015).

HD : domaine hydrophobe ; CHO : site de glycosylation ; GPI : l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol ; PrP^C : protéine prion cellulaire β : feuillets bêta, H (en rouge) : hélices alpha ; S-S : pont disulfure.

Dpl est codé par le gène *Prnd* situé sur le même locus que celui de la PrP^C (Figure 8) (Qin, O'Donnell, et Zhao, 2006). Cette protéine extracellulaire est exprimée dans les testicules. La délétion du gène *Prnd* chez la souris entraîne des altérations dans le système reproducteur masculin (Moore *et al.*, 1999 ; Behrens *et al.*, 2002). En parallèle, dès 1999, il a été mis en avant que la surexpression de Dpl entraîne une dégénérescence des cellules de Purkinje conduisant *in fine* à des ataxies chez l'animal (Moore *et al.*, 1999 ; Qin, O'Donnell, et Zhao, 2006). Tout comme la PrP^C, Dpl possède : deux sites de glycosylations, une structure enrichie en hélices α et une ancre GPI. Toutefois, seulement 24 % d'homologie de séquence protéique est observée entre les deux protéines (Qin, O'Donnell, et Zhao, 2006). Contrairement à la PrP^C, Dpl possède une région Nter très structurée (absence de région octapeptidique) et n'a pas la possibilité d'avoir une diversité de conformations (Benvegnù *et al.*, 2009).

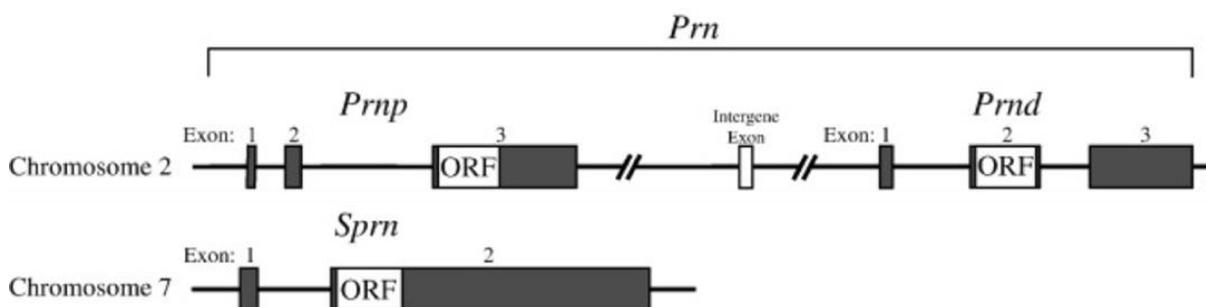


Figure 8 : Gènes murins *Prn* situé sur le chromosome 2 et *Sprn* sur le chromosome 7 (d'après Watts et Westaway, 2007). Les gènes *Prnp* et *Prnd* codent respectivement pour la PrP^C et Doppel. Le gène *Sprn* code pour la protéine Shadoo. ORF : cadre de lecture ouvert.

Shadoo n'est pas codé par le même gène que la PrP^C et Dpl, mais par le gène *Sprn* situé sur le chromosome 10 chez l'Homme (chromosome 7 chez la souris, Figure 8). Fortement conservée entre les espèces, cette protéine est retrouvée dans un modèle plus éloigné : le poisson zèbre (*Danio rerio*). Contrairement à Dpl, Shadoo possède des similarités importantes avec la PrP^C : (i) expression dans le SNC, (ii) ressemblance structurelle en Nter bien qu'un seul site de glycosylation et (iii) activité neuroprotectrice (Premzl *et al.*, 2003). Soulignons que l'expression de Shadoo est diminuée lors d'une infection prion ce qui laisse sous-entendre son implication dans les processus des ESTs.

2.3 Expression embryonnaire et distribution de la PrP^C dans l'organisme

La PrP^C est exprimée dès le stade embryonnaire, et est ensuite distribuée dans l'ensemble de l'organisme à l'âge adulte. Cette protéine ubiquitaire est exprimée dans tous les organes à des niveaux plus ou moins forts (Chesebro *et al.*, 1985 ; Robakis *et al.*, 1986 ; Bendheim *et al.*, 1992 ; Ford *et al.*, 2002 ; pour revue Linden *et al.*, 2008).

Expression embryonnaire

A l'état embryonnaire, l'expression de la PrP^C est révélée dès les stades précoces de développement (pour revue Miranda *et al.*, 2013).

En 2007, Tremblay et ses collaborateurs ont examiné l'expression du gène *Prnp* au cours du développement embryonnaire dans un modèle murin grâce au gène rapporteur, *lacZ*, codant pour la β -galactosidase (Tremblay *et al.*, 2007). Ces résultats mettent en évidence une expression précoce dès le 7,5^{ème} jour après la fécondation (stade embryonnaire E7,5) dans la crête neurale. Par hybridation *in situ* le transcrite PrP^C avait déjà été identifié dès le stade E6,5 dans la membrane extra-embryonnaire, et le 13,5^{ème} jour après fécondation dans les cellules neuronales et non neuronales chez l'embryon de souris (Manson *et al.*, 1992).

L'expression de la PrP^C au cours du développement ne cesse d'augmenter jusqu'à environ deux semaines après la naissance, puis elle stagne à l'âge adulte, et ceci même au cours d'une infection prion (Chesebro *et al.*, 1985). En effet, l'expression du transcrite de la PrP^C est plus importante dans les cellules souches embryonnaires que celle retrouvée dans les cellules somatiques (Grskovic *et al.*, 2007). La majorité des études ont été conduites chez les rongeurs (Lazarini, Deslys, et Dormont, 1991 ; Manson *et al.*, 1992 ; Salès *et al.* 2002 ; Miele *et al.*, 2003 ; Tremblay *et al.*, 2007), seule une étude a été réalisée chez l'Homme (Ade-Biassette *et al.*, 2006). Sur 25 fœtus âgés de 11 à 39 semaines gestationnelles, l'expression de la PrP^C est détectée dès la 11^{ème} semaine dans le télencéphale (Ade-Biassette *et al.*, 2006).

Distribution cérébrale à l'âge adulte

Les travaux de Ford et ses collaborateurs mettent en évidence par IHC, grâce à une optimisation des anticorps employés, une variation du niveau d'expression de la PrP^C chez la souris en fonction de la région cérébrale et des cellules neurales considérées (Ford *et al.*, 2002). Par exemple, elle est fortement exprimée dans la substance grise du cortex, du striatum et de l'hippocampe mais plus faiblement dans le thalamus. Elle est présente de façon modérée dans le cervelet et le tronc cérébral (Barmada *et al.*, 2004). Au niveau cellulaire, son expression est fortement marquée dans les neurones (McLennan *et al.*, 2004) et plus modérément dans les cellules gliales comprenant les cellules de Schwann, astrocytaires et microgliales (Follet *et al.*, 2002).

La PrP^C est, par exemple, plus fortement exprimée dans les neurones GABAergiques que dans les neurones dopaminergiques (Follet *et al.*, 2002). L'analyse du cervelet de souris en microscopie électronique a révélé la présence de PrP^C au niveau synaptique notamment dans les cellules de Purkinje (Haeberlé *et al.*, 2000). Certaines études ont révélé sa présence au niveau pré-synaptique (Herms *et al.*, 1999 ; Ferrer *et al.*, 2000) et post-synaptique (Haeberlé *et al.*, 2000). La PrP^C est également retrouvée dans le LCR.

Distribution dans les autres organes

La PrP^C est par exemple détectée dans une variété de tissus périphériques tels que les organes lymphoïdes. Elle est également exprimée dans un grand nombre de cellulaires immunitaires (pour revue Isaacs, Jackson, et Altmann, 2006) : les lymphocytes T et B (respectivement LT et LB), les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules natural killer et les cellules folliculaires dendritiques (FDCs).

La PrP^C est également retrouvée dans la circulation sanguine chez l'Homme (Dodelet et Cashman, 1998 ; Völkel *et al.*, 2001), les bovins (Paltrinieri *et al.* 2004) et les moutons (Hermann *et al.*, 2001 ; Halliday *et al.*, 2005). Au niveau cellulaire, la PrP^C est retrouvée dans les plaquettes (Holada *et al.*, 1998), les cellules endothéliales (Simák *et al.*, 2002) ainsi que les globules rouges (Panigaj *et al.*, 2005 ; Panigaj *et al.*, 2011 ; Glier *et al.*, 2015). L'une des hypothèses est que les cellules sanguines assurent la circulation de la PrP^C dans l'organisme et que cette dernière soit capable de les activer.

2.4 Différentes fonctions de la PrP^C

Bien que la PrP^C soit étudiée depuis plus de 20 ans, notamment pour son implication dans les maladies à prions, son rôle physiologique reste peu compris et de nombreuses fonctions lui ont été attribuées (Figure 9) (pour revue : Wulf, Senatore, et Aguzzi, 2017).

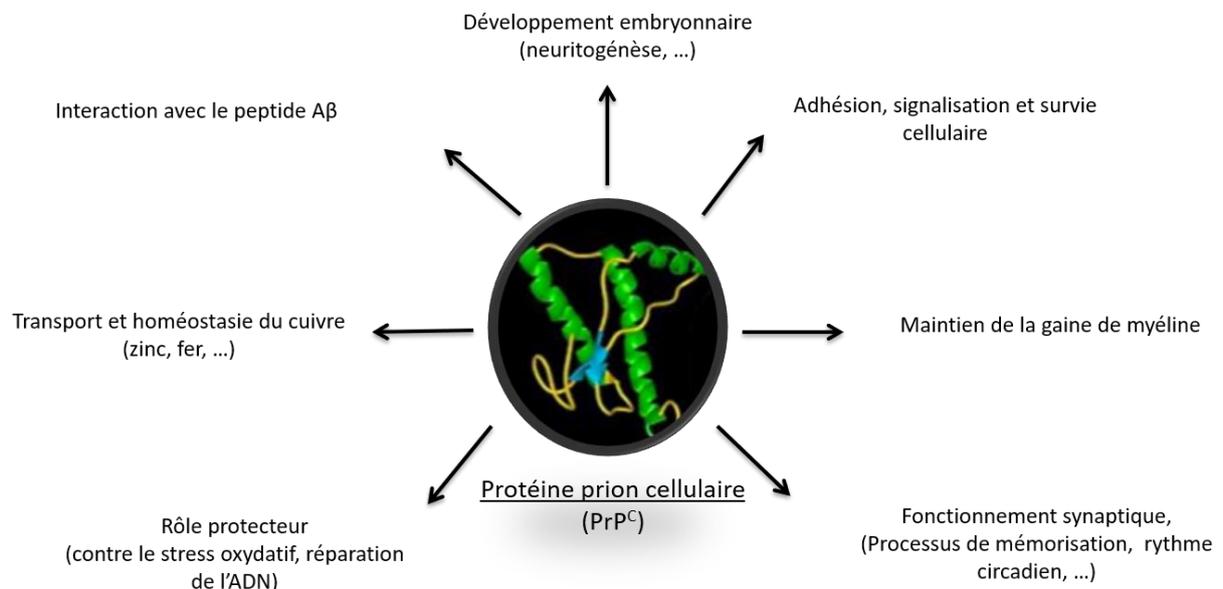


Figure 9 : Principaux rôles mis en évidence pour la protéine prion cellulaire (PrP^C).

Fonctions mises en évidence grâce aux souris délétées pour le gène *Prnp*, souris PrPKo

Une des façons d’appréhender le rôle de la PrP^C a été de générer des souris délétées pour le gène *Prnp* de façon plus ou moins large. Le postulat était que cette délétion entraînerait des altérations phénotypiques majeures chez l’animal étant donné (i) la présence ubiquitaire de la PrP^C chez tous les mammifères (ii) sa distribution majeure dans le SNC ainsi que (iii) sa grande conservation au cours de l’évolution chez les vertébrés. Pourtant les différents modèles murins générés de 1992 à 2016 (Tableau 4) sont viables et fertiles.

Tableau 4 : Souris délétées pour le gène *Prnp* générée de 1992 à 2016.

Années	Nom de la lignée	Références
1992	Zurich-1 (ZH1)	Büeler <i>et al.</i> , 1992
1994	<i>Npu</i>	Manson <i>et al.</i> , 1994b
1995	<i>Rcm0</i>	Moore <i>et al.</i> , 1995
1996	<i>Nagasaki (Ngsk)</i>	Sakaguchi <i>et al.</i> , 1996
2001	Zurich-2 (ZH2)	Rossi <i>et al.</i> , 2001
2001	<i>RiKn</i>	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
2016	Zurich-3 (ZH3)	Nuvolone <i>et al.</i> , 2016

Les premières souris générées remontent au début des années 90 : *Zurich I* abrégée en *ZH1* (Büeler *et al.*, 1992) et *Npu* (Manson *et al.*, 1994b). Toutes deux ne présentaient aucun phénotype remarquable (développement et comportement normaux). Des études postérieures souligneront chez ces souris, une diminution de la potentialisation à long terme (*Long-term potentiation*, LTP) essentielle aux mécanismes de mémorisation (Collinge *et al.*, 1994). En 2005, Criado et ses collaborateurs ont réussi à rétablir la LTP des souris *Npu* en réintroduisant la PrP^C (Criado *et al.*, 2005). En 1996, des perturbations du rythme circadien (sommeil/ éveil) (Tobler *et al.*, 1996) seront trouvées chez ces mêmes souris. Ces auteurs iront plus loin en proposant l’implication de dysfonctionnements de la PrP^C dans les insomnies décrites chez certains patients atteints d’IFF (Tobler *et al.*, 1996). Ces travaux soulignent **l’implication de la PrP^C dans les processus de mémorisation**. Chez l’homme, il a d’ailleurs été montré que la PrP^C serait impliquée dans la mémorisation à long terme (Papassotiropoulos *et al.*, 2005). Les individus MV et MM au codon 129 sont capables de se rappeler 17% de mots en plus, appris 24 heures auparavant, par rapport aux individus homozygotes pour la valine.

De 1995 à 2001, quatre autres souris PrPKo ont été générées : *Rcm0*, *Nagasaki (Ngsk)*, *ZH2* et *RiKn*. Elles présentent toutes des ataxies liées à une perte des cellules de Purkinje. Contrairement aux deux autres premières lignées, la délétion concerne non seulement le gène *Prnp* mais également les régions adjacentes, notamment *Prnd*, codant pour Dpl le paralogue de la PrP^C (Figure 8). Différentes études ont révélé que cette altération phénotypique n’est pas directement liée à une perte de fonction de la PrP^C. En effet, ces délétions larges ont pour conséquence une expression non contrôlée de Dpl qui contrairement à la condition physiologique va être fortement exprimée dans le cerveau de ces souris (Moore *et al.*, 1999 ; Qin, O’Donnell, et Zhao, 2006). Ainsi, la PrP^C est capable de **moduler l’expression de Dpl de façon antagoniste**. L’équipe de Nishida a restauré ce phénotype grâce à la réintroduction de la PrP^C (Nishida *et al.*, 1999). Au vu de ces résultats la PrP^C ne semble pas jouer un rôle central pour la survie de l’organisme à l’exception d’une résistance complète à l’infection par les prions (Büeler *et al.*, 1992).

Dès 1994, Manson et ses collaborateurs émettront l'hypothèse de la présence de phénomènes compensatoires en absence de la PrP^C (Manson *et al.*, 1994a). Différentes études postérieures soulignent l'implication d'au moins deux autres protéines (Dpl et Shadoo) possédant des rôles redondants de ceux de la PrP^C (Behrens, 2003 ; Young *et al.*, 2009). C'est ainsi qu'en 2009, l'étude de Young met en évidence la létalité des souris doubles KO pour la PrP^C et Shadoo (Young *et al.*, 2009) tandis que trois ans plus tard, l'étude de Daude et ses collaborateurs ne mettra pas en avant d'altération phénotypique claire (Daude *et al.*, 2012). La même année l'équipe de Passet soulignera le rôle de la PrP^C dans **le maintien des cellules trophoblastiques** et le contrôle de leur différenciation (Passet *et al.*, 2012) offrant ainsi une explication au phénotype léthal retrouvé chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, PrPKo (Málaga-Trillo *et al.*, 2009). En effet, physiologiquement la PrP^C est conservée chez le poisson zèbre (Cotto *et al.*, 2005). En 2015, Bakkedo et ses collaborateurs proposeront un nouveau concept selon lequel la PrP^C jouerait un rôle dans la quiescence immunologique en plus de la protection cellulaire (Bakkebo *et al.*, 2015). Ainsi, elle serait impliquée dans les processus anti-inflammatoires et son rôle protecteur ne serait mis en avant qu'en conditions pathologiques ce qui est cohérent avec une absence d'altération majeure dans les souris PrPKo.

La pluripotence, la différenciation et l'activation des cellules non matures

Comme décrit précédemment, la PrP^C est exprimée précocement au cours du développement (Manson *et al.* 1992 ; Tremblay *et al.*, 2007) suggérant un rôle dans **la pluripotence et la différenciation des cellules souches embryonnaires** (Steele *et al.*, 2006a ; Miranda *et al.*, 2011 ; Miranda *et al.*, 2013). Concrètement, dans les travaux de Steele et ses collaborateurs, des cultures primaires ont été réalisées issues de trois lignées murines : des souris (i) délétées pour la PrP^C murine (ii) conventionnelles exprimant la PrP^C murine (iii) sur-exprimant la PrP^C murine (Steele *et al.* 2006a). Ils observent que les souris PrPKo possèdent moins de cellules exprimant des marqueurs neuronaux et proportionnellement plus de cellules exprimant la Nestine, marqueur de la pluripotence des cellules souches. De plus, l'injection de Bromo-deoxyuridine (BrdU) qui s'incorpore lors de la réplication de l'ADN, souligne une diminution de la prolifération cellulaire dans ces souris PrPKo en comparaison des deux autres modèles murins.

Plus particulièrement, l'expression de la PrP^C est proportionnelle au degré de maturation des neurones (Miele *et al.*, 2003) soulignant son implication dans la **différenciation neuronale** (Mouillet-Richard *et al.*, 1999). Récemment, il a été montré que la PrP^C serait impliquée dans la neurogenèse des cellules souches neurales murines (Collins *et al.*, 2015). D'autres études ont également montré l'importance de la PrP^C au cours de la neuritogenèse et de la synaptogenèse (Lopes *et al.*, 2005) en mettant en avant le rôle neuroprotecteur de la PrP^C. Au cours de la neuritogenèse, il a été montré *in vitro* que la PrP^C intervient dans une des premières étapes clés permettant la polarisation des cellules souches neuronales (Loubet *et al.*, 2012).

La PrP^C est également impliquée dans **l'activation et la maturation des cellules non neuronales**, telles que celle des cellules immunitaires. Par exemple, une différence d'expression de la PrP^C est décrite entre les LT naïfs et matures (Cashman *et al.*, 1990 ; Li *et al.*, 2001). En parallèle, il a été montré qu'une absence d'expression de la PrP^C dans les LT entraîne un dysfonctionnement de réponse immunitaire (Mabbott *et al.*, 1997), suggérant ainsi l'importance du rôle de la PrP^C dans l'activation et la maturation des LT. Par ailleurs, les souris PrPKo présentent moins de cellules souches hématopoïétiques (Zhang *et al.*, 2006).

La biologie des cellules

D'une façon plus générale, la PrP^C joue un rôle dans la biologie des cellules notamment dans l'adhésion cellulaire. Cette propriété est rendue possible grâce à sa **capacité à interagir avec différents ligands** (pour revue : [Halliez et al., 2014](#) ; [Linden, 2017](#)). Les travaux de Graner et ses collaborateurs mettent en évidence l'importance de l'interaction de la PrP^C avec la laminine dans la formation des neurites dans des cultures de neurones hippocampiques de rat ([Graner et al., 2000](#)). Ces travaux confirment des données précédentes démontrant la forte affinité de la PrP^C pour le récepteur de la laminine ([Gauczynski et al., 2001](#)). De plus, il est connu que la PrP^C est capable de se lier à différentes isoformes des molécules d'adhérence cellulaire CAM (*cell adhesion molecule*) ([Schmitt-Ulms et al., 2001](#)). Il a d'ailleurs été montré qu'une absence d'interaction entraîne des altérations dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules PrPKo générées grâce à la technologie Crispr-Cas9 ([Mehrabian et al., 2015](#)).

La PrP^C est également impliquée dans les **mécanismes de régulation des voies de signalisation cellulaire** ([Mouillet-Richard et al., 2000](#)). Il a par exemple été montré son implication dans la cascade de signalisation conduisant à l'activation d'une tyrosine kinase, Fyn, notamment engagée dans des fonctions neuronales, ainsi qu'à l'activation de deux protéines membranaires la cavéoline-1 et la clathrine ([Mouillet-Richard et al., 2000](#)). Depuis d'autres partenaires ont été identifiés ([Schneider et al., 2003](#)). Récemment, les travaux de l'équipe de Schneider soulignent que la kinase PDK1 pourrait être une cible thérapeutique commune à la maladie d'Alzheimer et aux ESTs ([Pietri et al., 2013](#)). Leurs études *in vitro* mettent en évidence qu'en bloquant l'activité de PDK1, par le biais d'une cascade protéique, la production d'A β et de PrP toxiques est diminuée. En 2015, la même équipe souligne suite à une infection prion, la surexpression d'une autre kinase, ROCK ([Alleaume-Butaux et al., 2015](#)). *In vitro*, sa dérégulation induit des atteintes neuronales (dysfonctionnement dans la polarisation cellulaire, neurotransmission, ...). En parallèle, le complexe PDK1 – ROCK entraîne une absence de clivage physiologique de la PrP^C ainsi qu'une accumulation de PrP anormale ([Alleaume-Butaux et al., 2015](#)).

Activité neuroprotectrice anti-oxydante

De nombreuses études se sont intéressées à l'activité neuroprotectrice anti-oxydante de la PrP^C ([Brown et Sassoon, 2002](#)). *In vitro*, la privation de sérum dans des cultures de neurones issues de souris PrPKo les rendent plus sensibles à l'apoptose ([Kawahara et al., 1999](#) ; [Kim et al., 2004](#) ; [Laroche-Pierre et al., 2009](#)). Inversement, la surexpression de la PrP^C permettrait de limiter la mort neuronale suite à un stimulus apoptotique ([Li et Harris, 2005](#)). Le même phénomène protecteur est décrit lors d'une ischémie ([McLennan et al., 2004](#)). Confirmé dans des modèles murins, les auteurs sont partis du constat que l'analyse *post-mortem* de cerveaux humains hypoxiques présentait une accumulation de PrP^C en périphérie des zones lésionnelles ([McLennan et al., 2004](#)). L'analyse de coupes organotypiques de rétine souligne que la PrP^C est impliquée dans un équilibre fin en inhibant les voies de l'apoptose et en favorisant celles impliquées dans la survie cellulaire ([Chiarini et al., 2002](#) ; [Zanata et al., 2002](#) ; [Roucou, Gains, et LeBlanc, 2004](#)). D'autres études vont plus loin dans la compréhension des mécanismes en soulignant l'importance du fragment N1 pour d'une part assurer la neuroprotection et d'autre part limiter la mort cellulaire ([Guillot-Sestier et al., 2009](#) ; [Niezanski et al., 2012](#)). Récemment il a été mis en évidence dans des modèles cellulaires et murins le rôle de la PrP^C dans les processus de réparation de l'ADN en interaction avec l'endonucléase APE1 ([Bravard et al., 2015](#)).

Le maintien de la gaine de myéline

Ce rôle a été initialement suggéré suite à la génération des souris PrPKo (*ZH1* et *Npu*) qui présentaient une polyneuropathie démyélinisante chronique (Büeler *et al.*, 1992 ; Manson *et al.*, 1994b). En 2010, Bremer et ses collaborateurs mettront en évidence que ces processus de démyélinisations sont causés par une absence d'expression de la PrP^C au niveau des neurones et plus particulièrement du fragment C1 (Bremer *et al.*, 2010). Ainsi, la PrP^C est impliquée dans l'intégrité des nerfs périphériques assurant la transduction du signal des cellules de Schwann aux neurones (Bremer *et al.*, 2010). En 2016, les souris *ZH3* générées par la même équipe présentent de façon âge-dépendant une réduction significative de la densité axonale des nerfs sciatiques soulignant une nouvelle fois l'implication de la PrP^C dans le maintien de la myéline (Nuvolone *et al.*, 2016).

Le fonctionnement synaptique

La concentration importante de la PrP^C dans les synapses suggère son implication dans le fonctionnement synaptique, comme le précisaient les enregistrements sur tranches hippocampiques de souris PrPKo en 1994 (Collinge *et al.*, 1994). Il a été montré que la PrP^C est capable d'interagir par exemple avec différents récepteurs métabotropiques du glutamate, mGlu, (Beraldo *et al.*, 2011) et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate, NMDA, (Khosravani *et al.*, 2008). Sa régulation permet de limiter la toxicité du glutamate lors de la transmission synaptique en empêchant son hyperactivation (pour revue Black *et al.*, 2014). Elle serait également impliquée dans la transmission au niveau des jonctions neuromusculaires (Re *et al.*, 2006).

Le transport et l'homéostasie cellulaire de différents ions métalliques

La PrP^C joue un rôle dans le transport et l'homéostasie cellulaire de différents ions métalliques (Davies et Brown 2008 ; Toni *et al.*, 2017). L'association entre le métal et la PrP^C est bien établie, et le cuivre (Thompsett *et al.*, 2005), le zinc (Walter *et al.*, 2007), le fer (Davies et Brown 2009) et le manganèse (Brazier *et al.*, 2008) sont connus pour avoir une affinité avec la PrP^C. Ces ions sont capables de stabiliser la protéine en se liant au niveau de la région des octapeptides (OR, Figure 4) (Benetti *et al.*, 2014). Différentes études ont mis en avant l'implication de la PrP^C dans l'homéostasie du cuivre (Brown *et al.*, 1997 ; Pass *et al.*, 2015). Dernièrement Gasperini et son équipe ont montré que le rôle neuroprotecteur de la PrP^C dans la modulation des récepteurs NMDA résulterait d'une coopération entre la PrP^C et les ions cupriques (Gasperini *et al.*, 2015).

Interaction avec le peptide A β

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux marqueurs neuropathologiques : une accumulation extracellulaire de plaques amyloïdes (principalement composé du peptide β amyloïde, A β) et de dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires (enrichies en protéine tau hyperphosphorylée). En 2009, le séquençage génomique de différents clones cellulaires a mis en évidence la capacité des oligomères A β à se lier à la forme entière de la PrP^C (Laurén *et al.*, 2009). Cette même étude souligne que la délétion de PrP (étude sur tranches organotypiques issues de souris PrPKo) ou son blocage (utilisation d'anticorps anti-PrP) entraîne une absence de fixation des oligomères d'A β . Récemment, il a été montré que ces oligomères étaient également capables de se fixer sur le fragment N1 de la PrP^C (Guillot-Sestier *et al.*, 2012 ; Fluharty *et al.*, 2013). Chez la souris, le site de liaison de l'A β se trouve en position 95-110 sur la PrP^C (Laurén *et al.*, 2009 ; Calella *et al.*, 2010 ; Nieznanski *et al.* 2012) ainsi qu'en position 23-27 (Chen, Yadav, et Surewicz, 2010). En 2011, une co-immunoprécipitation de la PrP^C et du peptide A β a été mise en évidence dans le cerveau de patients Alzheimer non retrouvée dans ceux des individus contrôles (Zou *et al.*, 2011).

Ainsi, ces travaux suggèrent l'existence d'une interaction entre la PrP^C et le peptide Aβ notamment sous leurs formes insolubles. Récemment, il a été montré que la PrP^C jouerait un rôle de récepteur et de médiateur de la toxicité de l'Aβ : le fragment N1 aurait un rôle de ligand inhibiteur compétitif afin de limiter les effets pathologiques de l'Aβ (Altmeyden *et al.*, 2013).

3- La protéine prion pathologique

À ce jour, la seule modification moléculaire connue dans les maladies à prions est l'accumulation anormale de l'isoforme pathologique de la PrP. Ce paragraphe est l'occasion de préciser le vocabulaire employé dans ce manuscrit et de façon plus large de souligner les différences sémantiques existantes (Tableau 5).

Le terme de PrP sorti de son contexte peut être mal interprété et il convient de stipuler si l'on décrit la forme physiologique, PrP^C, présente chez tous les patients, ou son isoforme pathologique. Comme détaillé précédemment, les ESTs touchent un large panel de mammifères, il est donc possible de préciser la maladie en exposant de l'abréviation PrP (PrP^{VMCJ}, PrP^{CWD}, PrP^{BSE}, ...). Afin de s'affranchir de cette notation qui peut s'avérer rébarbative, Brown et Cervenakova ont proposé le terme de PrP^{TSE} (Brown et Cervenakova, 2005). Certains auteurs généralisent en ajoutant une majuscule sur le « P » de Prion afin d'englober la forme anormale de la PrP et le concept prion lui-même. Cette notation offre l'avantage d'étendre le concept de protéines mal conformées aux autres protéinopathies incluant par exemple : la maladie de Parkinson (alpha-synucléine), la maladie d'Alzheimer (Aβ42 et tau hyperphosphorylée).

Il peut exister un amalgame entre PrP^{Sc}, initialement mis en place pour décrire l'infectiosité de l'agent de la tremblante et la PrP^{res} soulignant le caractère résistant à la protéolyse par la protéinase K (PK)⁹. La forme anormale peut être partiellement résistante aux protéases et devra être abrégée en PrP^{res}. Ce terme sous-entend qu'un traitement à la PK a été employé afin de purifier la PrP^{res} pour ensuite la détecter en WB par exemple. Précisons que certaines ESTs présentent une infectiosité sans PrP^{res} détectable (Lasmézas *et al.*, 1997 ; Collinge *et al.* 1995 ; Kaatz *et al.*, 2012). Dans la suite du manuscrit la notion de PrP^{Sc} fera référence à la présence d'infectiosité.

En opposition à la PrP^{res}, la PrP^{sen} présente une forte sensibilité à la PK. Cet agent est par exemple retrouvé dans les prionopathies à sensibilité variable à la protéolyse (Gambetti *et al.*, 2008 ; Zou *et al.*, 2010). Inversement, certaines études ont mis en évidence la présence de porteurs asymptomatiques possédant de la PrP^{res} sans pour autant avoir développé une maladie à prions (Dickinson 1975 ; Peden *et al.*, 2004).

⁹ La Protéinase K (PK) est une cystéine protéase avec un site actif non spécifique du substrat.

Tableau 5 : Description des différentes nomenclatures retrouvées dans la littérature du Prion

Nom	Signification de l'abréviation	Description
PRNP	Gène codant pour la PrP	Code pour les deux isoformes de la protéine prion (physiologique et pathologique)
PrP	Protéine prion	Terme générique
PrP ^C	PrP cellulaire	Retrouvée en condition physiologique
PrP ^{res}	PrP résistante à la PK	Ne fait pas référence à l'infectiosité/ Souligne la résistance partielle, de la PrP anormalement conformée, à la digestion par les protéases
PrP27-30	PrP après digestion PK avec des profils électrophorétiques compris entre 27 et 30 kDa	Description historique de l'agent et de ses poids moléculaires suite à l'utilisation de traitements par les protéases
PrP ^{Sen}	PrP sensible à la PK	Non PrP ^{res} (à une dose de PK donnée)
PrP ^{Sc} , PrP ^{MCI} ...	PrP retrouvée dans une maladie donnée	Référence au caractère infectieux de l'agent

3.1 Étude structurale de la PrP pathologique

Les deux isoformes de la PrP, physiologique et pathologique, sont codées par le même gène (Basler *et al.*, 1986). Elles possèdent la même structure primaire (séquence d'aa), et subissent les mêmes modifications post-traductionnelles (Barry et Prusiner 1986 ; Stahl *et al.*, 1993). Aucune modification chimique entre les deux isoformes n'a été rapportée (Stahl *et al.*, 1993). La seule différence réside dans leurs structures secondaires : conformation et/ ou état d'assemblage différents (Riesner, 2003). En 1991, Caughey et son équipe obtiendront la structure 3D de la forme anormale de la PrP par spectroscopie (Caughey *et al.*, 1991). Deux ans plus tard, l'équipe de Prusiner comparera les deux isoformes en utilisant la même technique (Pan *et al.*, 1993).

Biochimiquement, l'isoforme anormale de la PrP présente une structure secondaire enrichie en feuillets β qui lui confère des propriétés physico-chimiques différentes (Riek *et al.*, 1996 ; Riek *et al.*, 1997) (Tableau 6). Cette conformation limite l'action des protéases qui ont moins accès aux aa pour dégrader l'isoforme anormale. Ainsi, tandis que la PrP^C est totalement digérée par la PK, le profil électrophorétique de la PrP^{res} après digestion enzymatique est caractérisé par la présence de trois bandes en WB.

Tableau 6 : Comparaison des deux isoformes de la protéine prion (PrP).

Caractéristiques	Protéine prion cellulaire	Protéine prion anormale
Hélices alpha (%)	42%	30%
Feuillets bêta (%)	3%	43%
Profil électrophorétique	4 bandes	3 bandes
Statut	Monomère	Agrégée
Résistance PK	Sensible	Partiellement résistante
Solubilité dans les détergents	Soluble	Insoluble
Digestion PIPL (ancrage GPI)	Sensible	Résistante
Infectiosité	Non	Oui

Bien que la distinction de la PrP^C de la PrP^{res} repose classiquement sur une étape préliminaire de digestion par la PK, d'autres méthodes sont également employées (insolubilité dans les détergents, l'urée, tendance à l'agrégation, ...).

3.2 Résistance aux procédés de décontaminations classiques

Les mesures de décontamination et d'inactivation habituellement employées sur les agents pathogènes classiques sont inefficaces contre la PrP anormale. L'agent infectieux des maladies à prions est résistant à la sonication (technique souvent utilisée pour purifier la fraction infectieuse), aux rayonnements UV et ionisants, aux procédés physiques tels que la chaleur sèche jusqu'à 600°C. En 1994, Gibbs et ses collaborateurs mettront en évidence l'extrême résistance de la PrP anormale aux techniques de désinfection (Gibbs *et al.*, 1994) (Figure 10). Après réimplantation chez le chimpanzé d'électrodes incriminées dans des cas de contaminations iatrogènes chez l'Homme (Bernoulli *et al.*, 1977), l'animal développe une EST au bout de 18 mois. Dans cette étude, les électrodes avaient été désinfectées selon les procédures habituellement appliquées à l'époque (stérilisation au formol 10%) et démontrées par la suite comme inefficaces face au prion (Gajdusek et Gibbs, 1976).

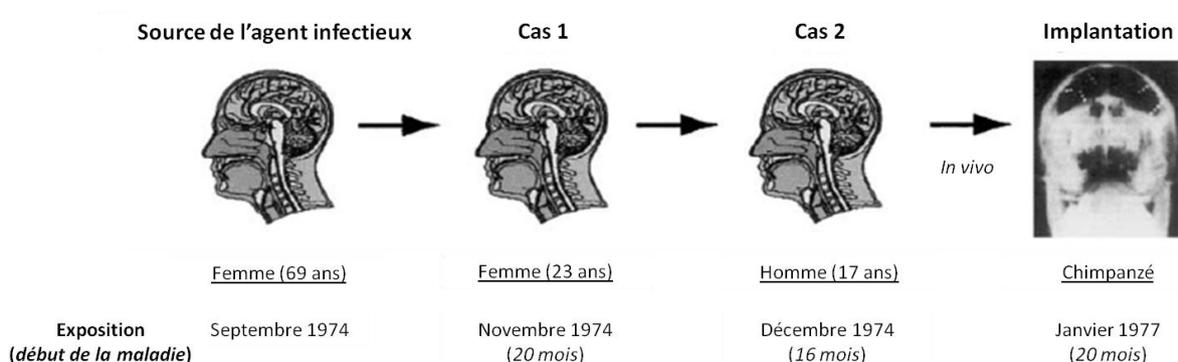


Figure 10 : Réimplantation chez le chimpanzé d'un jeu d'électrode incriminé dans des cas de contamination iatrogène de MCJ (d'après Weissmann *et al.*, 2002).

Les électrodes utilisées en implantation intracérébrale dans le cadre d'électroencéphalogrammes corticaux provenaient d'un patient probablement en phase asymptomatique de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Après réutilisation de ces électrodes, deux patients ont par la suite développé une forme iatrogène de MCJ : 16 et 20 mois après implantation (Bernoulli *et al.*, 1977). Gibbs et son équipe ont réimplanté ces électrodes, préalablement désinfectées selon les procédures classiquement utilisées (éthanol 70%, benzène et formol 10%) dans le cerveau d'un chimpanzé qui développera à son tour une maladie à prion (Gibbs *et al.*, 1994).

Bien que des différences soient décrites entre les différentes souches notamment humaines (Taylor *et al.*, 1994), les principales procédures de décontamination recommandées par l'OMS sont :

- L'immersion dans la soude (1N, 40g/L) pendant 1h à température ambiante ;
- L'immersion dans l'eau de javel (20 000 ppm soit 2% de chlore actif) pendant 1h à température ambiante ;
- La stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes.

Toutefois la majorité des instruments ne résiste pas à ces procédures et l'utilisation de matériel à usage unique reste difficile à envisager en termes de coût et de bénéfice/ risque face au faible nombre de cas de MCJ. Par ailleurs, ces procédés ont été validés sur des homogénats de cerveaux infectieux, or la décontamination de surface répond à d'autres mécanismes et à des propriétés physiques différentes.

En effet, il a été démontré ultérieurement l'efficacité de traitements moins drastiques (compatibles avec des instruments médicaux) pour éliminer et/ ou inactiver une contamination de surface par les prions.

On peut citer par exemple l'emploi du peroxyde d'hydrogène (Fichet *et al.*, 2004) ou différents produits commerciaux dont la liste est disponible sur le site de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, ANSM (Anios, Dr Weigert, Steris, ...).

Ainsi un mode opératoire spécifique, dénommé « Protocole Standard Prion » a pour objectif d'évaluer l'efficacité de différents produits ou procédés contre les prions sur les dispositifs médicaux.

3.3 Le caractère transmissible

Une des particularités des maladies à prions réside dans le fait qu'elles soient transmissibles. En 1936, la tremblante fut la première maladie à prion démontrée comme transmissible par voie intracérébrale (Cuillé et Chelle, 1936). Par la suite, différentes transmissions chez le chimpanzé, notamment, permettent de confirmer le caractère transmissible des maladies à prions (Gajdusek, Gibbs, et Alpers, 1967 ; Gibbs *et al.*, 1968). En parallèle, différentes voies d'administration de l'agent pathologique ont été décrites de façon naturelle : par voie orale (Kuru, produits animaux contaminés par l'agent de l'ESB), iatrogène (greffe de dure mère, injection d'hormone de croissance, transfusion), ou expérimentale (voies intracérébrale, intrapéritonéale, ...). Expérimentalement, la voie d'inoculation la plus efficace en termes de raccourcissement des périodes d'incubation et d'efficacité d'infection (taux de transmission chez l'animal) est la voie intracérébrale (Ironside 2006).

Dans un contexte thérapeutique chez l'animal différents accidents iatrogènes ont eu lieu.

En 1946, une campagne de vaccination de mouton contre l'encéphalomyélite ovine¹⁰ est entreprise par le vétérinaire écossais William Gordon (Gordon, 1946). Le vaccin était préparé à partir de moutons probablement infectés par l'agent de la tremblante et la charge infectieuse atténuée avec une solution de formol 10% (démonstré comme inefficace contre l'agent). Sur un total de 18 000 animaux vaccinés, 7% ont développé une tremblante.

En 2001, un autre cas de transmission accidentelle chez la chèvre et le mouton a été observé suite à une campagne de vaccination en Italie contre *Mycoplasma agalactiae* (Caramelli *et al.*, 2001).

3.4 Notions de souche et de barrière d'espèce

Bien avant la mise en évidence de la forme anormale de la PrP, les expériences de Pattison et Mitson en 1961 soulignent la présence de **l'effet souche**¹¹ (Pattison et Mitson, 1961). Suite à des inoculations intracérébrales chez la chèvre de deux formes de tremblante caractérisées par deux symptomatologies différentes (une forme avec des troubles nerveux majeurs et une seconde avec des démangeaisons sévères), les animaux receveurs ont développé deux formes cliniques distinctes (Pattison et Mitson, 1961). La même année Chandler mettra également en avant la transmission expérimentale de deux souches de tremblante chez la souris (Chandler, 1961).

L'effet souche dépend de la voie d'inoculation (Aguzzi et Sigurdson, 2004). Traditionnellement, une souche est caractérisée par : des signes cliniques, une durée d'incubation (période entre l'inoculation et le début des signes cliniques, (Bessen et Marsh, 1992) et un profil lésionnel (degrés d'intensité de la spongiose dans différentes zones cérébrales, (Fraser et Dickinson, 1973). Ces différents éléments sont fidèlement transmissibles après différents passages.

¹⁰La méningo-encéphalite, appelée *looping ill* en anglais, touche les ovins. Elle est causée par un virus de la famille des *Flavivirus*, appelé virus LIV, et transmis via des tiques.

¹¹Ce principe est généralement utilisé en bactériologie ou en virologie : il désigne la capacité d'une colonie à donner différents clones identiques après une série de repiquages.

Toutefois, une adaptation de souche est souvent primordiale. En effet, d'une espèce à l'autre la transmission n'est pas initialement efficace et peut nécessiter plusieurs passages successifs au sein de la même espèce avant de se stabiliser. Chandler observera ce **phénomène d'adaptation de souche**. Pour cela, il réalisera des transmissions successives (quatre passages au total) chez la souris (injection de broyats de cerveau de souris infectée lors de la première inoculation à une autre souris, etc.) (Chandler, 1962). Lors des quatre passages, une réduction progressive de la durée d'incubation est observée, signe d'une adaptation de l'agent à son nouvel hôte. En effet, l'adaptation de souche est caractérisée par un raccourcissement de la période d'incubation chez une espèce donnée (Chandler, 1962 ; Kimberlin et Walker, 1977). La transmission d'une espèce à l'autre est moins efficace qu'au sein de la même espèce : c'est le **phénomène de barrière d'espèces**. Toutefois, même après différents passages expérimentaux, il est possible que la transmission d'une espèce à l'autre ne soit jamais efficace à cause d'une barrière d'espèce trop importante.

L'effet souche est tout à fait compatible avec l'hypothèse prion, et a été confirmé par exemple chez la levure (Tanaka *et al.*, 2004). Dans cette étude, différentes conformations protéiques stables et distinctes ont été générées (Tanaka *et al.*, 2004). La diversité de souche pourrait donc reposer sur la variabilité des conformations spatiales de la PrP anormale (Prusiner *et al.*, 1990 ; Collinge *et al.*, 1999 ; Peretz *et al.*, 2001 ; Collins *et al.* 2006). Cela serait cohérent avec l'extrême flexibilité de la partie Nter de la protéine qui est à l'origine de différents clivages protéolytiques (Chen *et al.*, 1995).

Caractérisation des souches

En plus des critères biologiques (incluant les signes cliniques, la période d'incubation et les profils lésionnels), la caractérisation des souches est possible sur la base de critères biochimiques (étude des différents poids moléculaires et proportions des formes glycosylées). Les souches peuvent être également caractérisées par leurs propriétés d'agrégation.

De nos jours la méthode la plus utilisée est la réalisation d'un typage moléculaire. Concrètement, cela consiste en l'analyse des profils de migration électrophorétique de la PrP^{res} et des ratios entre les différentes glycoformes. Cela a conduit en 1996 à proposer deux classifications chez l'Homme :

- **La classification de Collinge et Hill**
- **La classification de Parchi et Gambetti**

La classification de Collinge regroupe quatre types de conformations : les types 1 et 2 pour les formes sporadiques de MCJ, le type 3 pour les formes iatrogènes et le type 4 pour la variante de la MCJ (Collinge *et al.* 1996 ; Hill *et al.*, 2003).

La classification de Parchi quant à elle ne comporte que deux types : le type 1 associé à une hauteur de bande de 21 kDa et le type 2 correspondant à 19 kDa. Le type 1 de la classification de Parchi englobe les deux premiers types de celle de Collinge) et le type 2 correspond à la vMCJ (caractérisée 2b) (Parchi *et al.*, 2011). L'équipe de Parchi est allée plus loin en proposant différents sous-types chez les patients sporadiques, cohérents avec les caractéristiques cliniques et le polymorphisme du codon 129 : MM1/ MV1/ MV2/ VV2 et deux autres mineurs MM2 et VV1 (Parchi *et al.*, 1999).

Le concept prion remet en cause le dogme selon lequel une maladie infectieuse est causée par la présence d'un être vivant capable de répliquer son ARN ou ADN, puisqu'ici seule une accumulation anormale de PrP est décrite. Le cadre de lecture du gène *Prnp* étant contenu dans un seul exon pour les deux isoformes, seules des modifications post-traductionnelles sont envisageables dans le processus d'infection des maladies à prions. Ainsi, l'élément majeur pour avoir une infection prion efficace est la présence de l'isoforme physiologique de l'hôte, la PrP^C. Les propriétés particulières de l'agent (absence de décontamination par les techniques classiques, infectiosité, large panel des souches) soulignent une fois de plus la complexité de l'agent et le risque en termes de santé publique.

Chapitre III : Pathogénèse des maladies à prions

Dans les maladies à prions, plusieurs lieux et mécanismes de conversion de la PrP^C en son isoforme anormale ont été proposés. Les ESTs sont caractérisées par des lésions restreintes au SNC notamment une mort neuronale importante. Pourtant l'agent infectieux est retrouvé dans différents organes périphériques (muscles, rein, ...), les fluides biologiques (salive, sang, urine, ...), et a été démontré comme capable de se disséminer et de se répliquer dans les organes lymphoïdes. De plus, la majorité des maladies à prions sont transmises par voie orale ou par administration périphérique, ce qui pose la question de savoir comment l'agent infectieux trouve accès au SNC. D'une manière générale, la physiopathologie des maladies à prions dépend de l'hôte, de la souche et du mode de contamination (porte et voie d'administration).

1- Conversion de la PrP^C en PrP anormale

1.1 Lieux de conversion

Différents lieux de conversion de la PrP^C en son isoforme anormale ont été proposés tels que la membrane plasmique, les vésicules endosomales ou le RE (Veith *et al.*, 2009). La difficulté à déterminer clairement les lieux de conversion peut s'expliquer notamment par des contraintes techniques afin de distinguer :

- **La PrP^C de son isoforme anormale ;**
- **L'inoculum initialement ajouté de la PrP anormale néoformée ;**
- **Le site de conversion des sites d'accumulation et de répllication.**

Grâce à son ancre GPI, la PrP^C est attachée à la surface externe de la cellule, plus précisément au niveau des régions riches en cholestérol et en phospholipides appelées radeaux lipidiques ou « *raft* » en anglais. Dès 1995, l'importance du cholestérol a été mise en évidence dans la formation de PrP^{Sc} (Taraboulos *et al.*, 1995). Dans cette étude, les auteurs ont réussi à diminuer la formation de PrP^{Sc} en rendant impossible l'ancrage de la PrP^C à la membrane dans un modèle cellulaire permissif à l'infection prion, les cellules N2a (Taraboulos *et al.*, 1995). Deux ans plus tard, une nouvelle étude dans le même modèle *in vitro* renforce l'idée que la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} se situe au niveau des *rafts*, en visualisant les deux isoformes à cet endroit (Naslavsky *et al.*, 1997). Goold et ses collaborateurs ont réussi à mettre au point un modèle cellulaire de neuroblastomes murins chimériques composés : d'une PrP^C couplée à une étiquette, MYC, et déficient pour leur PrP^C endogène (Goold *et al.*, 2011). Suite à une exposition avec la souche expérimentale de tremblante adaptée à la souris, RML (*Rocky Mountain Laboratory*), les auteurs observent très rapidement, en immunofluorescence, la formation *de novo* de PrP^{res} à la membrane plasmique grâce au rapporteur MYC (Goold *et al.*, 2011). Cette étude souligne également que la conversion semble se poursuivre dans le compartiment endosomal (Goold *et al.*, 2011) comme cela avait déjà été décrit (Borchelt, Taraboulos, et Prusiner, 1992).

Ces différentes données laissent supposer qu'une dérégulation de l'homéostasie cérébrale du cholestérol jouerait un rôle dans les maladies à prions et de façon plus large dans les autres maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Simons *et al.*, 1998 ; Hannaoui *et al.*, 2014).

1.2 Mécanismes de conversion et de réplication

Comme le souligne les expériences réalisées chez les souris PrPKo, la PrP^C est au cœur de la réplication de l'agent infectieux dans l'organisme. De façon schématique le processus de transconformation correspond à une première étape de conversion suivie d'une étape d'amplification associée à la présence d'oligomérisation de monomères mal repliés, formant des protofibrilles puis des fibrilles et des plaques amyloïdes. La capacité de recruter et de convertir des protéines solubles en agrégats est appelé processus de polymérisation ou « *seeding* » en anglais (Figure 11).

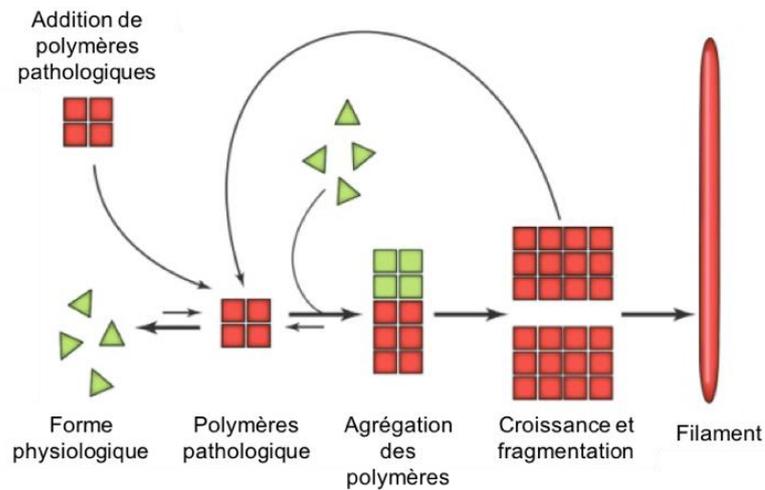


Figure 11 : Processus de polymérisation d'une protéine soluble (forme physiologique) en son isoforme insoluble et anormalement repliée (forme pathologique) (d'après Fritsch et al., 2013).

À ce jour le mécanisme de conversion de la PrP^C en son isoforme anormale n'est pas compris, et pour tenter d'expliquer ce phénomène de transconformation deux modèles ont été proposés (Figure 12) :

- **Le modèle de l'hétérodimère** encore appelé modèle de conversion assistée ;
- **Le modèle de nucléation-polymérisation** (traduit de l'anglais « *seeded-nucleation* »).

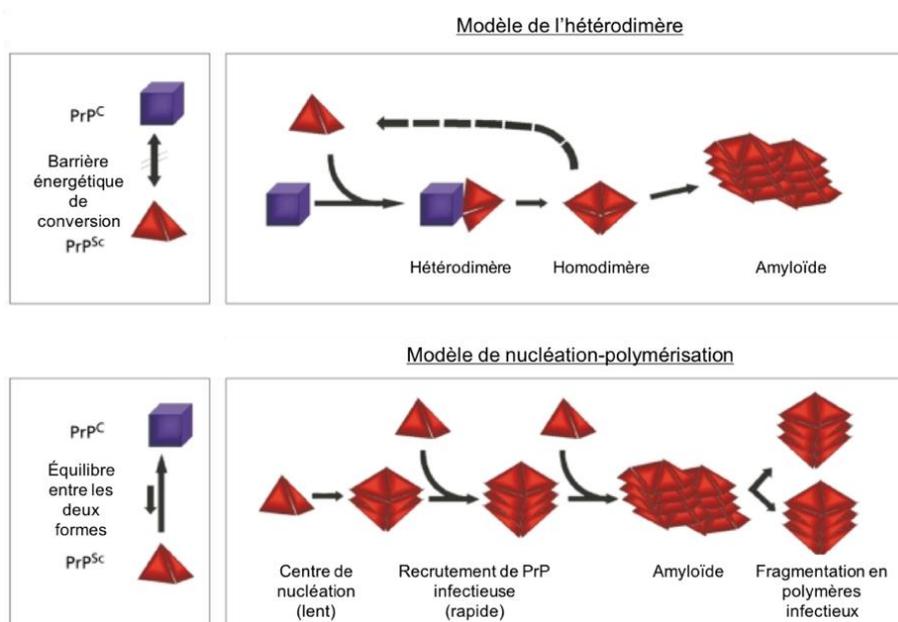


Figure 12 : Deux modèles de conversion de la PrP^C en son isoforme anormale (d'après Aguzzi, 2001).

Le premier **modèle de l'hétérodimère** a été proposé par Prusiner (Prusiner, 1991). Selon ce modèle, la simple interaction entre la PrP^C et la PrP^{Sc} entrainerait directement sa conversion en sa forme anormale. Ce modèle nécessite que la PrP^{Sc} soit (i) thermodynamiquement plus stable que la PrP^C, et (ii) qu'elle soit sous forme monomérique. Toutefois, aucune donnée n'a permis de mettre en évidence la présence de monomère de PrP^{Sc}, car cela est cinétiquement inaccessible. Une des possibilités serait d'avoir un intermédiaire noté PrP* qui permettrait d'augmenter l'énergie de la réaction vers l'isoforme PrP^{Sc} (Huang, Prusiner, et Cohen, 1996).

Selon le **modèle de nucléation-polymérisation**, la PrP^{Sc} existe à l'état d'équilibre avec la PrP^C. Ce second modèle est indirect et nécessite une étape intermédiaire de formation de noyaux de PrP^{Sc}. Lors de la première réaction, la génération de nucléation d'hétérodimères de PrP^{Sc} est lente et réversible (Jarrett et Lansbury, 1993). Cette réaction est en faveur de la PrP^C d'un point de vue thermodynamique. Dans la seconde étape, il y a recrutement des monomères de PrP^{Sc} au sein de ces polymères : cette conversion est alors irréversible (Kocisko *et al.*, 1994 ; Lansbury et Caughey, 1995). L'élément limitant de ce modèle est la nucléation c'est-à-dire que le recyclage de la PrP^C doit être moins efficace que les processus d'agrégation. Selon ce modèle, la PrP^{Sc} n'est pas stable sous forme monomérique, ce qui est tout à fait compatible avec les données actuelles qui stipulent que l'agent infectieux est sous forme d'agrégats (Saborio, Permanne, et Soto, 2001 ; Silveira *et al.*, 2005).

1.3 Neurotoxicité des Prions

Les lésions observées dans les maladies à prions sont restreintes au SNC. La neuropathologie est caractérisée par une spongiose (vacuolisation), une gliose (activation astrocytaire et microgliale) et une mort neuronale massive. Deux hypothèses majeures ont été proposées pour expliquer cette neurotoxicité :

- **L'hypothèse du gain de fonction** : souligne que les effets neurotoxiques soient directement liés aux propriétés de la PrP anormalement conformée ;
- **L'hypothèse de la perte de fonction** : implique que la diminution de disponibilité de la PrP^C (car transconformée en PrP anormale) l'empêche de réaliser ses fonctions physiologiques.

En 2011, les travaux de Sandberg et son équipe soulignent une absence de corrélation entre l'infectiosité et la toxicité en mettant en avant deux phases distinctes : une première de production de l'infectiosité, et une seconde de toxicité (Sandberg *et al.*, 2011). Dans cette étude, suite à des injections intracérébrales de la souche RML dans différents modèles murins, la neurotoxicité apparaît lorsque la réplication de PrP^{Sc} atteint son maximum. Ainsi, les dépôts de PrP^{Sc} ne sont pas forcément liés à la neurotoxicité mais pourraient être deux événements indépendants (Sandberg *et al.*, 2011). Récemment, l'étude d'Haïk et son équipe réalisée, cette fois-ci, *in vitro*, rapporte les mêmes résultats (Hannaoui *et al.*, 2013). L'exposition de différentes souches de prion à des cultures primaires murines de neurones issues de la couche granulaire du cervelet, du cortex et du striatum mettent en évidence : (i) un tropisme de souche en fonction des régions cérébrales (ii) un effet neurotoxique retrouvé *in vitro*, et (iii) la présence d'une première phase de réplication de l'agent suivie d'une seconde phase de neurotoxicité. D'autres études soulignent que la neurotoxicité apparaît alors qu'un faible niveau de PrP^{Sc} est retrouvé (Lasmézas *et al.*, 1997 ; Manson *et al.*, 1999). Des résultats similaires sont retrouvés chez l'Homme suite à l'analyse *post-mortem* de différents cerveaux de patients atteints de forme sporadique de MCJ (Faucheux *et al.*, 2011).

Il semble de plus en plus admis par la communauté scientifique que la neurotoxicité corresponde à une perte des fonctions physiologiques de la PrP^C, au vu de son rôle neuroprotecteur (anti-oxydant et anti-apoptotique). Il a d'ailleurs été montré que suite à une infection Prion, les cellules infectées sont plus sensibles au stress oxydatif que les cellules saines, c'est-à-dire non exposées (Milhavet et Lehmann, 2002). En 2007, il a été proposé que la neurotoxicité observée dans les maladies à prions soit causée par des oligomères de PrP anormaux, notés PrP^L (« L » pour létal) distincts de la PrP^{Sc} et générés lors de la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc} (Collinge et Clarke, 2007). D'autres dysfonctionnements de la PrP^C ont été proposés comme une modification de l'homéostasie du cuivre (Toni *et al.*, 2017).

2- Propagation des Prions au sein de l'organisme

2.1 De l'entrée du prion à l'accumulation dans les organes périphériques

Dans les maladies à prions, deux modes de contaminations sont possibles, par voies **centrale** ou **périphérique** (Figure 13).

Expérimentalement (réalisé dans le cadre de protocoles scientifiques sur animal de laboratoire), la voie centrale est la plus efficace, et conduira rapidement au développement d'une EST dans la mesure où l'agent infectieux est directement présent dans le SNC. Chez l'Homme, des cas de contaminations iatrogènes par voie centrale ont également eu lieu suite à des greffes de dure-mère ou de cornée, ou directement via l'implantation d'électrodes contaminées lors d'électro-encéphalogrammes corticaux.

La majorité des maladies à prions humaines a été transmise suite à une contamination par voie périphérique. En effet, elle regroupe tous les autres modes de transmissions comme par exemple les cas de contamination suite à des injections d'hormones de croissance par voie intramusculaire, ou encore par voie orale suite à l'ingestion d'aliments contaminés.

De façon intéressante, une atteinte précoce des organes du système lymphoréticulaire secondaire (SLR)¹² est presque toujours observée lors de contamination périphérique (Eklund *et al.*, 1967 ; Patisson et Jones, 1968 ; Fraser et Dickinson, 1970 ; Kimberlin et Walker, 1979).

¹²Le système lymphoréticulaire (SLR) est constitué des tissus lymphoïdes primaires et secondaires. Les tissus lymphoïdes primaires correspondent aux lieux de fabrication des lymphocytes T et B (le thymus et la moelle osseuse). Tandis que les structures lymphoïdes secondaires correspondent aux lieux où les lymphocytes remplissent leurs fonctions (la rate, les ganglions lymphatiques, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et les amygdales).

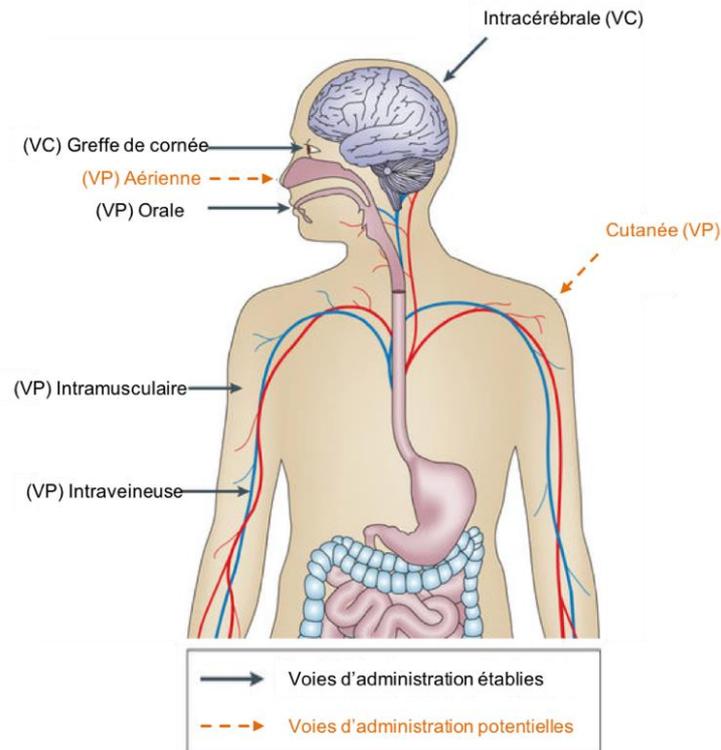


Figure 13 : Représentation des différentes voies d'administration des Prions (d'après Aguzzi et al., 2013).

Les voies d'administration établies des Prions (intracérébrale, greffes de cornée, intramusculaire, orale et intraveineuse) sont à opposer aux voies dites potentielles (cutanée et aérienne). Les modes de contamination peuvent être par voies centrale (VC) ou périphérique (VP).

La dissémination de l'agent de la périphérie au SNC suit deux phases :

- Une phase précoce et silencieuse correspondant à l'invasion du système lymphoréticulaire (**lymphoinvasion**) ;
- Une phase tardive et lésionnelle associée au passage de l'agent du système lymphoréticulaire au système nerveux et sa dissémination du système nerveux périphérique (SNP) vers le SNC (**neuroinvasion**).

Quelle que soit la voie de dissémination de l'agent dans l'organisme, les cellules impliquées dans le transport de l'infectiosité expriment la PrP^C.

2.2 Exemple du schéma pathogénique des ESTs suite à une contamination par voie orale

Lors d'une contamination par voie orale, les intestins sont les premiers touchés comme cela a été décrit chez le mouton (Hadlow, Kennedy, et Race, 1982 ; Androletti et al., 2000). L'infectiosité franchit ensuite la barrière intestinale selon un mécanisme peu compris, soit directement par transcytose (Mabbott et MacPherson, 2006) soit aux dépens des cellules épithéliales de la muqueuse, cellules M¹³ (Heppner et al., 2001). L'importance de ces cellules a été confirmée dans un modèle murin transgénique : leur déplétion empêche l'infection prion (Donaldson et al., 2012).

¹³ Les cellules M, ou *Microfold*, sont des cellules épithéliales de l'intestin qui assurent notamment le transport d'antigènes au travers de l'épithélium.

Une fois la barrière intestinale franchie, la PrP^{Sc} peut être phagocytée par les cellules présentatrices d'antigène telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Elle migre alors via les vaisseaux lymphatiques vers les structures lymphoïdes secondaires pour s'accumuler notamment dans les cellules dendritiques folliculaires (FDCs).

2.3 Des organes lymphoïdes à la réplication dans les cellules dendritiques folliculaires

Dès l'accumulation dans les organes lymphoïdes, la physiopathologie des Prions suit les mêmes processus de réplication quelle que soit la voie d'entrée.

Les organes lymphoïdes

L'infectiosité est d'abord détectable dans les tissus lymphatiques drainant le site d'inoculation. Par exemple, lors d'une contamination par voie orale, la PrP^{Sc} est retrouvée dans les plaques de Peyer puis dans les ganglions mésentériques (Hadlow, Kennedy, et Race, 1982 ; Androletti *et al.*, 2000). Il a d'ailleurs été montré en 2003 que les plaques de Peyer jouent un rôle majeur dans la transmission efficace des prions suite à une exposition par voie orale (Prinz *et al.*, 2003).

Dès les stades précoces de l'infection, une réplication de l'agent infectieux est retrouvée dans la rate, et ceci même après une injection IC. Kimberlin et Walker mettent en évidence qu'avant même de détecter la PrP anormale dans le cerveau, son accumulation est retrouvée dans la rate suite à une inoculation intrapéritonéale (Kimberlin et Walker, 1988). L'année suivante les mêmes auteurs souligneront le rôle majeur de la rate dans le développement des maladies à prions, grâce à une splénectomie : la période d'incubation sera rallongée en comparaison des souris saines (Kimberlin et Walker, 1989). Ces résultats sont souche-dépendant. Il a été montré que l'agent infectieux y serait acheminé par la voie hématogène depuis le site d'injection (Kimberlin et Walker, 1988 ; Urayama *et al.*, 2011). Expérimentalement, la PrP^C est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, BHE (Banks *et al.*, 2004 ; Banks *et al.*, 2009). Ces données laissent sous-entendre que la neuroinvasion via la circulation sanguine est possible notamment suite à des transfusions sanguines. Chez l'Homme, une réplication périphérique de l'isoforme anormale de la PrP est décrite pour les patients vMCJ ainsi qu'en moindre quantité pour les formes sporadiques (Glatzel *et al.*, 2003).

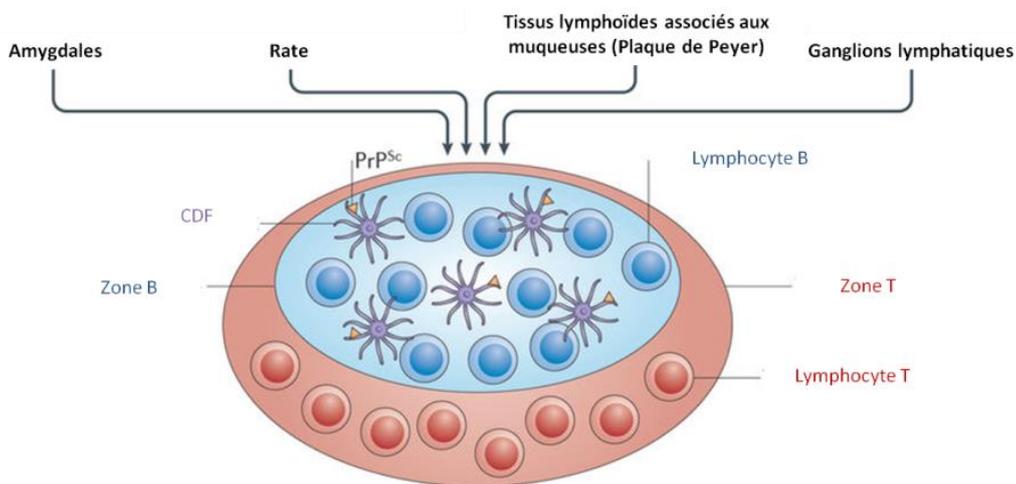


Figure 14 : Représentation de la réplication périphérique dans les cellules dendritiques folliculaires situées dans les tissus lymphoïdes secondaires (d'après Aguzzi, Nuvolone, et Zhu, 2013).

Les tissus lymphoïdes secondaires correspondent à l'amygdale, la rate, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et les ganglions lymphatiques. L'infectiosité de la PrP^{Sc} est schématisée par un triangle jaune. CDF : cellule folliculaire dendritique.

Au niveau cellulaire : les FDCs

Situées dans les zones B des follicules des tissus lymphoïdes, les FDCs assurent d'une part la capture de l'antigène grâce à leurs dendrites et d'autre part la présentation de l'antigène aux LB (Figure 14). Contrairement aux autres cellules présentatrices de l'antigène, elles n'ont pas une origine hématopoïétique mais stromale.

Deux arguments ont laissé suggérer que les FDCs puissent être un des sièges de l'accumulation et surtout de la réplication de l'infectiosité. Le premier réside dans la longue durée de vie des CDF qui leur permettent de piéger pendant plusieurs mois l'antigène, ce qui est tout à fait compatible avec les grandes phases d'incubation silencieuse décrites dans les maladies à prions (Mabbott et MacPherson, 2006). Le second argument majeur est que les FDCs expriment de façon importante la PrP^C (Burthem *et al.*, 2001 ; Krautler *et al.*, 2012).

En 2000, Montrasio et son équipe ont réussi à abolir la fonctionnalité de ces cellules grâce à une injection de lymphotoxine β empêchant la maturation des LB nécessaire à celle des FDCs (Montrasio *et al.*, 2001). Suite à une inoculation intrapéritonéale de l'agent infectieux, aucune accumulation de PrP^{Sc} n'a été mise en évidence dans la rate de ces souris, et un allongement de la période d'incubation a eu lieu (Montrasio *et al.*, 2000). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Prinz *et al.*, 2002 ; Mabbott *et al.*, 2003). Ainsi, les LB jouent un rôle dans le développement des maladies à prions en vue de permettre la maturation des FDCs (Blättler *et al.*, 1997 ; Klein *et al.*, 1998 ; Montrasio *et al.*, 2001). L'inoculation de l'agent infectieux par voie intrapéritonéale à des souris préalablement irradiées (déplétion des cellules souches lympho-hématopoïétiques) n'entraîne aucune accumulation de PrP anormale dans la rate (Raeber *et al.*, 1999 ; Raeber *et al.*, 2001).

Ainsi, l'accumulation précoce de la PrP^{Sc} dans les tissus lymphoïdes et notamment dans les FDCs semble être un processus indispensable pour une neuroinvasion efficace. Toutefois, les FDCs ne sont pas systématiquement impliquées dans la propagation de la PrP^{Sc} suite à l'inoculation à de fortes doses (Prinz *et al.*, 2002) ou lors d'une exposition directe par voie intracérébrale (Mabbott *et al.*, 2000). Cela souligne la capacité de certaines souches, en fonction de l'espèce de l'hôte et de la voie d'inoculation, à avoir une neuroinvasion directe sans accumulation périphérique préalable et détectable.

2.4 Des organes lymphoïdes à la multiplication dans le système nerveux

Le passage des organes lymphoïdes au système nerveux périphérique n'est pas clairement élucidé. Toutefois la colonisation de la PrP^{Sc} nécessite l'expression de la PrP^C, qui continue à se former, dans les tissus impliqués (Blättler *et al.*, 1997 ; Mabbott et MacPherson, 2006).

La dissémination de la PrP^{Sc} dans le SNC peut emprunter une voie dépendante de la moelle épinière grâce aux nerfs parasympathiques (Kimberlin et Walker, 1980 ; Beekes, Baldauf, et Diringer, 1996) ou indépendante en passant directement par les nerfs sympathiques tels que le nerf vague (Beekes, McBride, et Baldauf, 1998) (Figure 15).

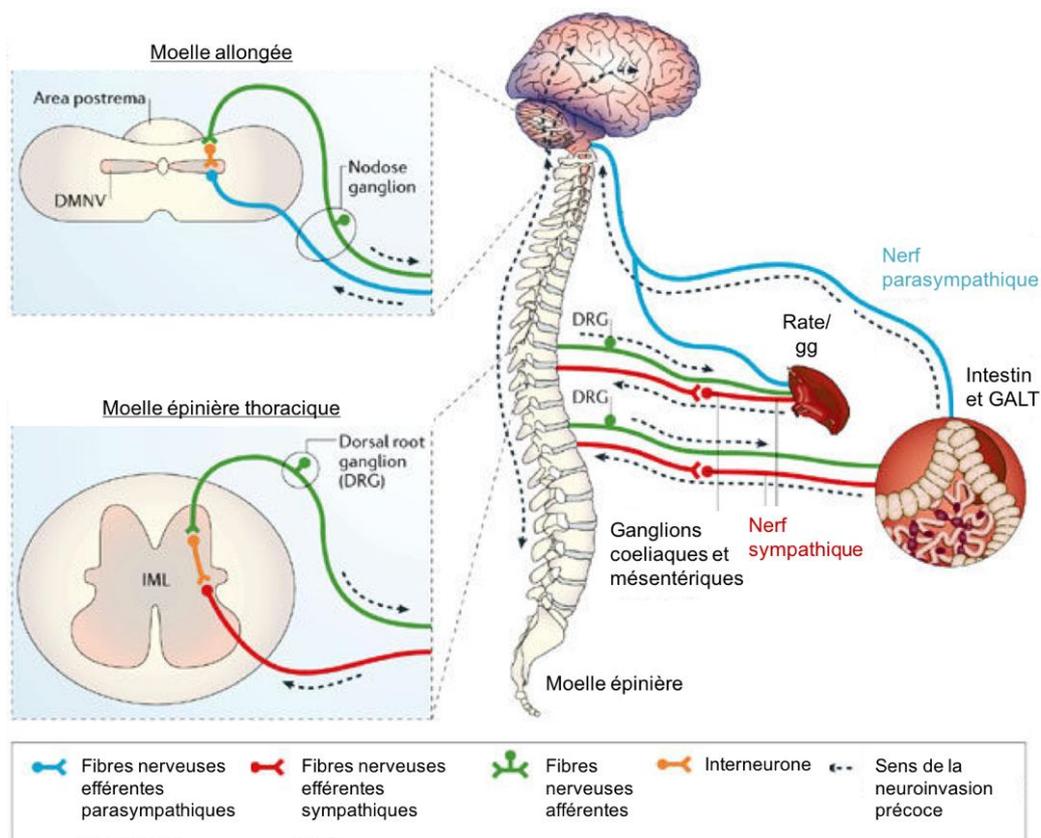


Figure 15 : Voies de la neuroinvasion des prions (d'après Mabbott et MacPherson, 2006).

Il a été montré que les Prions colonisent le système nerveux central depuis l'intestin ou les tissus lymphoïdes secondaires selon deux voies neuroanatomiques distinctes. La première voie suit les fibres sympathiques du nerf splanchnique jusqu'à la colonne médullaire intermédiaire-latérale (IML) de la moelle épinière thoracique. La seconde voie est celle des fibres parasympathiques. GG : ganglion/ GALT : tissu lymphoïde associé au tube digestif/ DMNV : noyau dorsal du nerf vague.

À partir des tissus lymphoïdes, les prions colonisent le SNC via le système nerveux périphérique, par transport rétrograde. La dissémination de l'agent infectieux pourrait être directe grâce à la proximité anatomique qui existe entre les FDCs et les terminaisons neuronales du système sympathique qui innervent la rate (Clarke et Kimberlin, 1984 ; McBride et Beekes, 1999). En effet, les organes lymphoïdes sont fortement innervés par des fibres sympathiques. L'étude de Prinz et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence une amélioration de la neuroinvasion en réduisant artificiellement la distance entre les FDCs et ces nerfs spléniques, grâce au récepteur CXCR5 *in vivo* (Prinz *et al.*, 2003). À partir du SN entérique (plexus nerveux du tractus gastro-intestinal), la dissémination s'effectue par transport rétrograde grâce aux nerfs périphériques (nerfs splanchniques et/ ou vague).

En 2003, il a été montré que l'agent infectieux est capable de s'accumuler dans les neurones des ganglions sympathiques chez des patients atteints de la vMCJ (Haik *et al.*, 2003). Ces travaux soulignent l'implication des nerfs sympathiques dans la pathogénèse des contaminations par voie orale chez l'Homme.

L'infectiosité est capable de se propager de cellule à cellule. La dissémination des Prions vers les nerfs périphériques peut avoir lieu directement à partir des FDCs via les exosomes (Fevrier *et al.*, 2004). En 2007, l'expression de la PrP^C et de la PrP^{Sc} a été mise en évidence *in vitro* dans des exosomes suite à une exposition prion (Vella *et al.*, 2007). Ces travaux soulignent que les exosomes peuvent représenter un mode de dissémination de l'infectiosité dans l'organisme.

2.5 Du système nerveux aux organes périphériques

Après avoir atteint le SNC, la PrP^{Sc} se dissémine de façon centrifuge. En effet, la PrP anormale a été retrouvée dans les muscles de patients atteints de forme sporadique de MCJ (Glatzel *et al.*, 2003) ainsi que chez les cerfs atteints de CWD (Angers *et al.*, 2006). L'infectiosité est également retrouvée dans les reins et les urines. En 2005, les travaux de Seeger et ses collaborateurs soulignent l'accentuation de la prionurie dans un modèle murin d'inflammation rénale chronique (Seeger *et al.* 2005). Ces résultats sous-entendent que dans un contexte d'inflammation importante la dissémination de l'agent infectieux est plus efficace. Une grande partie de l'infectiosité est retrouvée dans le foie ce qui met en évidence son élimination importante et que seule une petite partie est responsable de la réplication de l'infectiosité. Cela a été mis en évidence grâce à des liposomes radiomarqués (Millson *et al.*, 1979).

Ainsi, le schéma pathogénique précis des maladies à prions reste à élucider. Nous savons qu'il dépend de la voie d'administration de l'agent infectieux. Dans la majorité des cas, une réplication périphérique est indispensable au développement de la maladie (Bartz *et al.*, 2005). Toutefois, certaines souches dites neurotropes ne présentent pas de réplication périphérique, et sont capables d'envahir directement le SNC (Mohri, Handa, et Tateishi, 1987). Inversement, certaines souches lymphotropes se répliquent efficacement en périphérie, et pour autant n'ont pas de neuroinvasion efficace (Bruce 1985 ; Béringue, Le Dur, *et al.*, 2008).

Lors d'une infection par voie périphérique, les organes lymphoïdes sont impliqués dans la pathogénèse des maladies à prions bien que le système immunitaire de l'hôte reste tolérant à l'accumulation de l'agent infectieux. Les mécanismes exacts de propagation tissulaire de la périphérie vers le niveau central ne sont pas clairement compris.

Deuxième partie :

Évaluation et prévention du risque Prion en termes de santé publique

L'agent responsable de l'ESB a réussi à franchir la barrière d'espèce Bovin – Homme conduisant à l'apparition d'une nouvelle maladie à prion humaine, la vMCJ. Au regard de la diminution significative du nombre de cas d'ESB grâce à la mise en place d'une série de mesures préventives, les pays membres de l'Union Européenne (RU inclus) sont considérés comme ayant un risque maîtrisé voire négligeable de voir apparaître de nouveaux cas et donc de transmission inter-espèce. En parallèle de ce **risque primaire** (suite à une transmission par voie orale), un **risque secondaire** (transmission iatrogène inter-individuelle) a été identifié avec trois cas avérés iatrogènes de vMCJ post-transfusionnels au RU.

L'évaluation du risque de la vMCJ nécessite de faire un bilan des données épidémiologiques incluant : (i) le nombre de cas de bovins infectés par l'ESB, et (ii) la fréquence des maladies à prions chez l'Homme. De plus, il est important de prendre en compte les individus asymptomatiques c'est-à-dire potentiellement en cours d'incubation, dans la mesure où ils pourront être d'éventuels donneurs de sang.

L'évaluation du risque de santé publique de la vMCJ est complexifiée par les principales caractéristiques atypiques de l'agent infectieux, à savoir :

- **Une forte résistance** dans l'environnement ainsi qu'aux procédés de décontamination habituels limitant les capacités d'inactivation voire de destruction de l'agent ;
- **Une absence de méthode de détection ante mortem** ;
- **Une réplication périphérique** : tropisme lymphoïde de la PrP^{vMC}, et présence de l'agent infectieux dans le sang (prionémie) ;
- **Une longue phase d'incubation silencieuse.**

Chapitre I : Analyse du risque de transmission primaire de la vMCJ

1- Étude descriptive de la transmission de l'agent de l'ESB à l'Homme

1.1 Situation épidémiologique internationale et nationale

Chez les bovins, l'agent causal de l'ESB a réussi à s'amplifier suite aux modifications des procédés de fabrication instaurées au RU dans les années 80, et à conduire à une anazootie.

Officiellement, 200 000 bovins ont été recensés atteints d'ESB dont 94% sur le territoire britannique. Avec un total de 1036 cas rapportés, la France est le quatrième pays le plus touché après le RU, l'Irlande et le Portugal. Actuellement, un recul est observé dans l'ensemble des pays initialement touchés par l'agent infectieux. En effet, seulement deux cas ont été rapportés en 2016, un premier en Espagne et un second en France (données issues de l'OMS mises à jour le 30 juin 2016).

Chez l'Homme, 228 cas de vMCJ ont été rapportés suite à l'ingestion de viandes contaminées (risque primaire), auxquels il faut ajouter les trois cas post-transfusionnels (risque secondaire) (Tableau 7).

Tableau 7 : Répartition mondiale du nombre de cas totaux de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) (d'après les données mises à jour le 03/07/2017 par *The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit*, eurocjd.ed.ac.uk).

Pays	Nombre de cas de vMCJ
	(Nombre de cas ayant séjourné au RU pendant plus de 6 mois entre 1980 – 1996)
Royaume-Uni	178*
France	27 (1)
Espagne	5
Irlande	4 (2)
États-Unis d'Amérique	4 (2)
Pays-Bas	3
Italie	3
Portugal	2
Canada	2 (1)
Japon	1
Taiwan	1 (1)
Arabie Saoudite	1
TOTAL	231

**3 cas de contamination post-transfusionnels*

Avec un total de 27 cas de vMCJ, **la France est le deuxième pays le plus touché après le RU** (Tableau 7). À ce jour, ces patients sont tous décédés, et étaient homozygotes méthionine au codon 129.

Trois hypothèses ont été envisagées pour expliquer la contamination de la population française, à savoir : (i) directement sur le sol britannique, (ii) suite à l'importation de viande contaminée en provenance du RU (iii) via des bovins nés en France ayant développé une ESB (Cohen et Valleron, 1999). Il apparaît que l'importation de viandes contaminées du RU soit à l'origine des cas français, en excluant l'individu ayant séjourné plus de six mois sur le territoire anglais pendant la période incriminée (Tableau 7). Cette hypothèse est cohérente avec les travaux de modélisation de l'épidémie d'ESB en France qui font état d'une diminution des nombres de cas à venir (Donnelly *et al.*, 2000 ; Donnelly *et al.*, 2002 ; Alperovitch et Will, 2002). En effet, il a été estimé qu'un faible nombre d'animaux infectés français soit entré dans la chaîne alimentaire humaine (Chadeau-Hyam et Alperovitch, 2005). En 2009, il a d'ailleurs été confirmé que la même souche d'ESB était à l'origine des cas recensés au RU et en France : typage moléculaire, lésions histologiques et symptomatologie identiques (Brandel *et al.*, 2009).

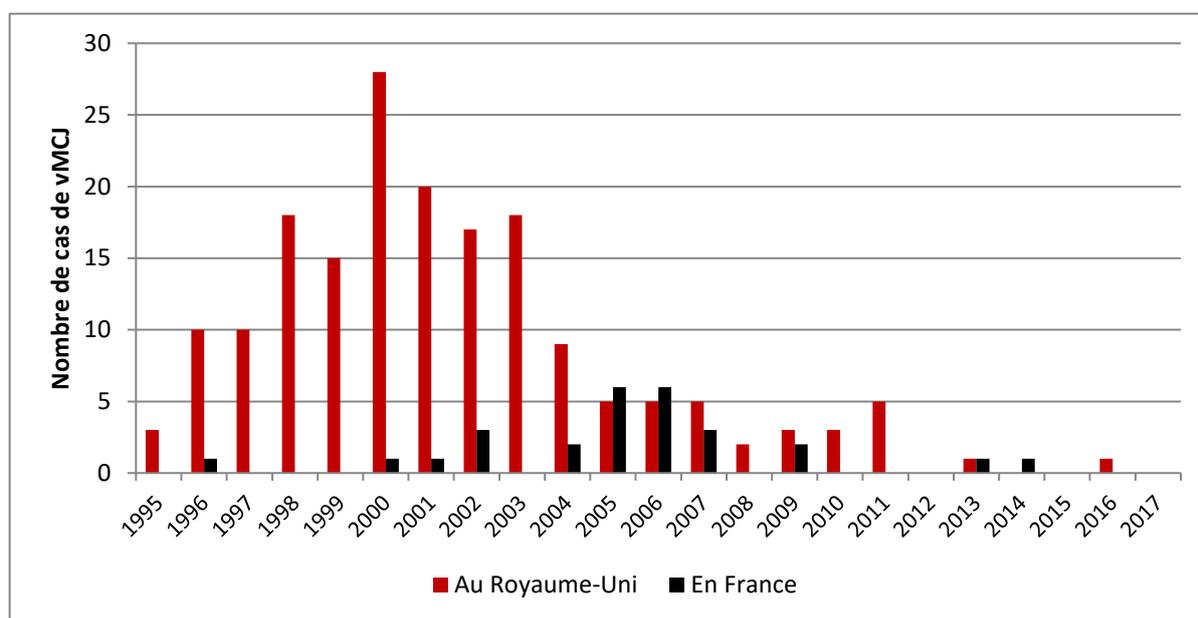


Figure 16 : Nombre de cas de variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) en France et au Royaume-Uni de 1995 à 2017 (d'après www.cjd.ed.ac.uk).

En France, le pic du nombre de cas de vMCJ est atteint entre 2005 et 2006, tandis qu'il est observé en 2000 au RU (Figure 16). Ce décalage de cinq ans peut être attribué à l'augmentation des importations (entre 1985 et 1995) de viande en provenance du RU vers la France avant l'embargo instauré en 1995. D'après les incidences cumulées de vMCJ, le niveau d'exposition alimentaire entre le RU et la France est de 175/26 cas soit un ratio de 6,7 (exclusion des trois cas post-transfusionnels britanniques et du cas français ayant séjourné au RU). De plus, l'analyse approfondie des données comparatives sur la consommation de viande entre le RU et la France et sur les importations en provenance du RU conduisent à un rapport d'exposition au risque alimentaire de l'ordre de 1/10, c'est-à-dire que la population française aurait été dix fois moins exposée que la population britannique (Clarke et Ghani, 2005).

Depuis 2003, le nombre de cas mondial de vMCJ est en constante diminution, et les cas recensés étaient tous nés avant la mise en place des mesures de protection (dès 1989) vis-à-vis du risque de l'agent de l'ESB.

1.2 Présentation des cas non homozygotes méthionine sur le codon 129 et notion de porteurs asymptomatiques

En 2016, le centre de référence britannique des MCJ (*National CJD research and Surveillance*) recense **le premier patient confirmé de vMCJ avec un génotype MV sur le codon 129**.

La description du cas a été publiée par Tzehow et ses collaborateurs en 2017 sous forme de *Lettre* ([Mok et al., 2017](#)). Le patient, décédé en 2016, était un homme britannique de 36 ans (naissance en 1980 au RU) sans facteur de risque associé de MCJ (sans antécédent chirurgical ni transfusionnel, aucune mutation sur le gène *Prnp*). Il présentait des troubles de la mémoire épisodique, une ataxie et des myoclonies. Aucun hypersignal du pulvinar ni d'anomalie pour la protéine 14-3-3 n'ont été observés. L'analyse immunohistologique *post-mortem* a révélé un faible marquage de PrP anormale dans la rate, mais qui n'est pas observé dans l'appendice ni dans les ganglions mésentériques. Cette atteinte limitée laisse suggérer une forme sporadique de MCJ. Toutefois, des plaques florides, caractéristiques de la vMCJ, ont été retrouvées lors de l'examen neuropathologique. Biochimiquement, le typage moléculaire montre un type 4 selon la classification de Collinge, spécifique de l'agent de la vMCJ ([Collinge et al., 1996](#)).

Ainsi, ce patient serait le premier cas avéré de vMCJ hétérozygote MV sur le codon 129 (Tableau 8), bien que certains marqueurs de diagnostic soulignent une forme sporadique. Précisons, que cet individu n'a jamais été donneur de sang ni d'organe, ce qui exclue toute contamination secondaire.

Tableau 8 : Répartition des génotypes au codon 129 en fonction des formes de MCJ (d'après [Brown et al., 2012](#)).

Polymorphisme au codon 129 du gène <i>Prnp</i> (%)	MM	MV	VV
Population générale caucasienne	40	10	50
sMCJ	67	17	16
iMCJ (hormone de croissance)	45	22	33
Variante de la MCJ	99.6	0.4	0

Des études antérieures soulignaient la **présence de porteurs asymptomatiques** hétérozygotes MV ([Peden et al., 2004](#) ; [Kaski et al., 2009](#) ; [Peden et al., 2010](#)) et homozygotes VV ([Ironsides et al., 2006](#)) sur le codon 129. En 2004, Peden et ses collaborateurs décrivent le décès d'une patiente asymptomatique hétérozygote sur le codon 129 (MV) ([Peden et al., 2004](#)). Cette patiente transfusée cinq ans auparavant (cas numéro 1, Tableau 12) faisait l'objet d'un suivi particulier car elle faisait partie de la cohorte des receveurs de produits sanguins labiles (PSL) issus d'un donneur ayant développé une vMCJ. L'analyse immunohistologique *post-mortem* met en évidence une PrP anormale dans la rate et les ganglions lymphatiques, non retrouvée dans le cerveau ([Peden et al., 2004](#) ; [Wadsworth et al., 2011](#)). L'une des hypothèses est que la neuroinvasion n'a pas eu le temps d'être efficace face à la longue période d'incubation décrite dans les maladies à prions. Récemment, il a été mis en évidence que contrairement à son cerveau, la rate de cet individu est infectieuse, et capable d'induire une EST dans un modèle murin conventionnel ([Bishop et al., 2013](#)).

En 2010, un autre porteur asymptomatique de génotype MV, hémophile, a été décrit avec une accumulation de PrP anormale dans la rate ([Peden et al., 2010](#)).

En 2009, l'équipe de Collinge retranscrit un cas probable de la vMCJ sur un autre individu MV (Kaski *et al.*, 2009). Cet homme de 30 ans présentait des signes cliniques caractéristiques d'une MCJ tels qu'un déclin intellectuel, des hallucinations visuelles ainsi qu'une sévère ataxie des membres inférieurs. En parallèle des marqueurs biologiques caractéristiques d'une vMCJ ont été retrouvés : une augmentation du taux de la protéine 14-3-3 dans le LCR, un hypersignal au niveau du pulvinar en IRM et un EEG non spécifique d'une MCJ sporadique. En l'absence d'autopsie effectuée ce cas reste probable (Kaski *et al.*, 2009).

Deux autres porteurs asymptomatiques, cette fois-ci VV, ont été décrits suite à l'analyse de pièces d'appendice post-opératoires (Hilton *et al.*, 2004 ; Ironside *et al.*, 2006). Dans les autres formes de MCJ, des patients avérés non MM pour le codon 129 ont déjà été identifiés (Tableau 8).

Ainsi, la présence d'infectiosité dans les organes périphériques de porteurs asymptomatiques soulève le problème du risque de contamination iatrogène notamment suite à des actes transfusionnels. La notion de porteurs sains n'est pas nouvelle, et avait été introduite dès 1975 par Dickinson (Dickinson, 1975). Ses travaux soulignaient la présence d'animaux avec une répllication périphérique de PrP anormale sans pour autant qu'une neuroinvasion efficace soit détectée. Chez l'Homme, la détection de PrP anormale est également retrouvée dans le cerveau d'individus cliniquement sains (Yuan *et al.*, 2006). Certains auteurs qualifient cette infection silencieuse de maladie à prions dormante (Nyström et Hammarström, 2014).

La question demeure toujours de savoir si les génotypes non homozygotes méthionine au codon 129 offrent un réel avantage en termes de survie ou si inversement un allongement de la durée d'incubation sera observé. Ce second scénario pourrait conduire à une nouvelle vague de contamination avec des périodes d'incubation plus longues.

2- Mesures générales de prévention contre l'agent de l'ESB

Depuis 1989 c'est-à-dire avant la détection des premiers cas de vMCJ, une série de mesures a été prise par la Commission Européenne pour gérer les risques liés à l'ESB. **Une traçabilité** a été mise en place permettant de suivre l'animal de sa naissance à l'achat par le consommateur. Dès juillet 1990, une interdiction de nourrir les animaux en vue de production pour l'alimentation humaine avec des **farines d'origine animale** a été ordonnée en France. Cette mesure visait à empêcher les contaminations croisées inter-espèces.

Par la suite, face à l'apparition des cas de contaminations chez l'Homme, différentes **agences sanitaires** ont été créées notamment : (i) l'Agence du médicament en 1993 (suite aux cas de contaminations iatrogènes par hormones hypophysaires), (ii) l'Agence française de sécurité alimentaire en 1998 (suite aux cas de vMCJ) et (iii) la Cellule de référence des MCJ en 1991.

Depuis 2001, **un système européen de surveillance** a été instauré grâce aux tests de dépistage rapide. Actuellement, seul l'agent de l'ESB (forme classique) est intégré dans la réglementation car il est le seul à avoir été démontré comme transmissible à l'Homme. Toutefois, une surveillance globale est réalisée pour la tremblante et les formes atypiques de l'ESB.

Initialement, la surveillance active (mise en place en France en 2001) consistait à tester systématiquement les animaux à risque : (i) âgés de plus de 24 mois (ii) retrouvés morts ou abattus d'urgence. Suite à la diminution du nombre de cas, la Commission Européenne a assoupli ces mesures. Ainsi, depuis 2013, les états membres de l'UE sont autorisés à tester uniquement les animaux à risque (abattus d'urgence et/ ou retrouvés morts).

La surveillance passive consiste à tester les animaux suspectés d'être atteints d'ESB. En cas d'apparition d'un cas dans le cheptel, des abattages sélectifs sont réalisés (bovins atteints d'ESB, leurs descendants et les animaux de la même cohorte d'âge).

Des mesures de précautions ont également été prises concernant l'alimentation humaine. Elles visent à **retirer de la chaîne alimentaire les organes les plus infectieux qualifiés de matériels à risques spécifiés (MRS)** tels que : (i) le cerveau, les yeux et la moelle épinière des animaux de plus de 12 mois (ii) les amygdales pour chaque animal ainsi que (iii) l'appareil intestinal et mésentérique des animaux nés dans les pays contrôlés. Ces organes doivent être éliminés du reste de la carcasse selon des règles particulières afin de limiter le risque de contamination de la chaîne de production industrielle.

3- Étude analytique de la transmission de l'agent de l'ESB à l'Homme

Un des éléments importants dans l'analyse du risque des maladies à prions humaines est d'estimer le nombre de cas de vMCJ à venir suite à l'ingestion de viande contaminée. Pour ce faire, il faut évaluer le nombre de bovins infectés et ceux potentiellement entrés dans l'alimentation humaine. Afin de réduire le risque de transmission, il est important de prendre en compte la prévalence de porteurs asymptomatiques, potentiels réservoirs pour les contaminations secondaires inter-humaines.

3.1 Les modèles de prédiction mathématique

Au RU, l'estimation du nombre de bovins infectés par l'ESB est difficile à établir car les premiers cas seraient apparus dès le début des années 80 (Collee et Bradley, 1997), tandis que les premières déclarations n'apparaissent qu'à partir de 1985 voire 1986. Différentes études estiment que le nombre de cas infectés entrés dans l'alimentation humaine est plus important que le nombre de cas recensés. Selon Anderson et son équipe, ce nombre serait de 400 000 bovins infectés, tandis que l'équipe de Ghani l'estime entre un à trois millions (Anderson et al., 1996 ; Ghani et al., 2003a). En 2014, une nouvelle estimation souligne que 10 millions de consommateurs auraient été exposés à des viandes contaminées (Chen et Wang, 2014).

Concernant **l'estimation du nombre de cas de vMCJ à venir**, beaucoup de modèles mathématiques ont été proposés (Ghani et al., 2000 ; Valleron et al., 2001 ; Ghani et al., 2003 ; Garske et Ghani, 2010). Initialement, les premiers calculs étaient alarmants, et estimaient que le nombre total de vMCJ au RU serait compris entre 80 000 et 130 000 (Cousens et al., 1997). Avant les années 2000, ces estimations étaient difficiles face à l'incertitude concernant la période d'incubation. Les études prédisaient ensuite qu'une centaine d'individus serait atteints de vMCJ au RU (Ghani et al., 2003b). Précisons, que ces modélisations ne prennent en compte ni le génotype sur le codon 129 ni la prévalence de porteurs asymptomatiques dans la population.

3.2 Les études de prévalence

Une étude de prévalence permet d'observer, à un moment donné, la fréquence de survenue d'une maladie dans une population précise. Elle correspond au rapport du nombre de malades dans une population d'intérêt sur l'effectif total étudié à un temps donné. Concernant les maladies à prions, les études de prévalence servent d'indicateur statistique pour estimer le nombre de personnes potentiellement en phase d'incubation silencieuse de vMCJ.

Elles ont été réalisées sur des pièces post-opératoires de tissus lymphoïdes préalablement anonymisées, amygdales et appendices, qui sont le siège de la réplication de l'agent en périphérie durant la phase préclinique de la maladie (Schreuder *et al.*, 1996 ; Hilton *et al.*, 1998). Ainsi, Hilton et ses collaborateurs mettent en évidence la présence de positivité dans l'appendice d'un patient huit mois avant le développement des signes cliniques d'une vMCJ, diagnostic confirmé *post-mortem* (Hilton *et al.*, 1998). La majorité des études ont utilisé l'immunohistochimie comme technique de détection de la PrP anormale. Les observations microscopiques ont ensuite été menées en aveugle par des experts anatomopathologistes.

Les échantillons analysés dans les études de prévalence proviennent tous d'individus britanniques correspondant à la population la plus fortement exposée à l'agent de l'ESB. Les auteurs ont souligné l'importance de regrouper les individus analysés en fonction de leur date de naissance et des périodes les plus à risque en termes d'exposition à l'agent de l'ESB (1961-1985) : 39 patients vMCJ étaient nés entre 1961-1969 et 99 entre 1970-1985 (sur 168 cas britanniques). À ce jour, cinq études de prévalences ont été réalisées (Tableau 9) :

- La première d'entre elles a permis d'identifier en IHC trois pièces d'appendices positives sur 12 674 analysées (Hilton *et al.*, 2004). Sur l'ensemble des amygdales analysées (1739) aucune ne présentait d'accumulation de PrP anormale. Parmi les trois échantillons positifs, le premier cas avait déjà été décrit en 2002 (Hilton *et al.*, 2002). Pour deux des prélèvements, l'analyse génétique a permis de mettre en évidence que les individus étaient VV au codon 129 (Ironsides *et al.*, 2006).
- La deuxième étude n'a pas permis de détecter de cas positif (2000 échantillons d'amygdales analysés) (Frosh *et al.*, 2004). Contrairement aux autres études, les auteurs ont utilisé comme technique de détection, en plus de l'IHC, le WB.
- La troisième a été menée sur 63 007 échantillons d'amygdales (Clewley *et al.*, 2009). Cette large étude n'a pas permis de mettre en évidence de cas positif. L'analyse a été faite par dépistage rapide par ELISA selon deux protocoles (Microsens et Biorad).
- La quatrième étude a consisté à analyser une nouvelle fois les pièces post-opératoires présentées par Clewley et son équipe (étude numéro 3) mais cette fois-ci par IHC (De Marco *et al.*, 2010). Un cas positif a été mis en évidence sur les 9160 échantillons testés. À ce jour, c'est la seule étude de prévalence ayant trouvé un prélèvement d'amygdale positif.
- La dernière étude a mis en évidence 16 échantillons d'appendices positifs sur les 32 441 analysés (Gill *et al.*, 2013). Récemment, cette même équipe semble confirmer ces résultats (Présentation orale lors du congrès Prion 2017 à Édinburgh).

Selon cette dernière étude, le nombre de porteurs sains dans la population britannique serait donc plus élevé que les données antérieures, avec une prévalence d'environ 1 sur 2000 habitants dans la cohorte d'âge la plus exposée au risque primaire (Gill *et al.*, 2013). Cette prévalence élevée pose un réel risque en termes de santé publique dans la mesure où ces individus sont potentiellement des donneurs de sang, et pourraient conduire à l'apparition de nouveaux cas de contaminations secondaires.

Toutefois, les études de prévalence présentent plusieurs limites. La première concerne le devenir des porteurs asymptomatiques : il apparaît impossible de déterminer si ces individus développeront ou non une vMCJ. De plus, ces études analysent les tissus lymphoïdes (amygdales et appendices) autres que la rate qui est l'organe connu pour avoir une plus forte réplification périphérique. Enfin, différentes études mettent en évidence la présence de patients vMCJ qui ne présentent pas de réplification périphérique détectable (Joiner *et al.*, 2005 ; Brandel *et al.*, 2009 ; Mok *et al.*, 2017). Ces deux derniers éléments permettent d'émettre l'hypothèse que la prévalence de porteurs asymptomatiques pourrait être plus importante dans la population britannique. À ce jour, aucune étude n'a été réalisée en France.

Tableau 9 : Présentation des cinq études de prévalence réalisées sur des pièces post-opératoires provenant de patients britanniques.

Numéro d'apparition des études	1	2	3	4	5
Années de publication de l'étude	2004	2004	2009	2010	2013
Méthodes d'analyse	IHC	WB + IHC	ELISA	IHC	IHC
Nombre de pièces d' <u>amygdales</u> positives/ Nombre de pièces totales analysées	0/1427	0/2000	0/ 32 661	1/9 160 ¹	-
Nombre de pièces d' <u>appendices</u> positives/ Nombre de pièces totales analysées	3/12 674	-	-	-	16/32 441
Analyse génétique du codon 129	VV (2/3)	-	-	-	8/16 (MM) 4/16 (VV) 4/16 (MV)
Prévalence (intervalle de confiance de 95%) pour une cohorte d'âge de sujets nés entre 1961 et 1985	292 par million d'habitants	-	0 (<30) par million d'habitants	109 par million d'habitants	412 par million d'habitants
Autre prévalence	-	0 (<500) par million d'habitants (1995 et 1999)	0 (<30) par million d'habitants (1961 et 1995)	-	733 par million d'habitants (1941 et 1960)
Références	Hilton <i>et al.</i> , 2004	Frosh <i>et al.</i> , 2004	Clewley <i>et al.</i> , 2009	de Marco <i>et al.</i> , 2010	Gill <i>et al.</i> , 2013

¹Cas positif en immunohistochimie mais négatif en ELISA

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay / IHC : immunohistochimie/ M : methionine/ V : valine/ WB : western blot

4- Théories expliquant la discordance entre la forte exposition et le nombre de patients vMCJ observé

Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer la discordance entre le nombre important de bovins infectés (et potentiellement exposés) et la relative « faible » incidence de patients vMCJ (Mayor, 2005 ; Clarke et Ghani, 2005).

L'hypothèse privilégiée actuellement est l'**existence d'une forte barrière d'espèce** entre les bovins et l'Homme qui expliquerait le faible taux de transmission. La majorité des souris conventionnelles sont résistantes à l'agent de l'ESB par voies IC et orale. Concernant les souris humanisées, de faibles taux de transmission sont également observés et une adaptation de la souche à son hôte au moyen de passages secondaires reste souvent nécessaire (Asante *et al.*, 2002 ; Béringue, Herzog, *et al.*, 2008).

Une autre explication serait que la susceptibilité de développer une vMCJ soit liée à l'**âge de l'individu au moment de l'exposition**. Contrairement aux autres formes de MCJ, les patients atteints de vMCJ étaient jeunes (âge moyen des décès 28 ans). Bien que cette distribution ne soit pas comprise, la susceptibilité de développer une vMCJ pourrait être accrue en raison de facteurs biologiques, non identifiés à ce jour, présents chez les individus jeunes (Gore, 1997). Au vu de la longue période d'incubation décrite dans les maladies à prions, il est raisonnable de supposer que ces individus aient été exposés au cours de leur enfance voire adolescence. La seconde hypothèse est que les habitudes alimentaires différaient en fonction de l'âge du consommateur. Toutefois, il a été montré en 2004 une absence de corrélation entre une consommation excessive de viande et l'apparition de la maladie (Boëlle, Cesbron, et Valleron, 2004).

L'écart entre le nombre de bovins contaminés entrés dans la chaîne alimentaire humaine et le nombre de cas humains déclarés pourrait être expliqué par **une différence d'exposition de la population**. Une des hypothèses est que les patients vMCJ aient été exposés à de fortes doses, tandis que le reste de la population aurait consommé des aliments moins infectieux. Deux théories sont alors envisageables : (i) soit les doses ingérées étaient trop faibles pour être efficaces soit (ii) ces individus sont actuellement en cours d'incubation. Différentes études réalisées *in vivo* ont révélé que la période d'incubation est dépendante de la dose (Diringer *et al.*, 1998 ; Wells *et al.*, 2007 ; Konold *et al.*, 2012). Comme les études de prévalence le soulignent, ces individus auraient une lymphoinvasion efficace mais sans pour autant avoir développé de MCJ (Gill *et al.*, 2013). Concernant le devenir de ces porteurs asymptomatiques, là encore deux issues sont envisageables : (i) les individus décéderont avant l'apparition des signes cliniques compte tenu de la longue période d'incubation (ii) la neuroinvasion sera efficace, et les individus développeront une vMCJ. Dans ces deux cas, ces individus représentent donc un risque pour la population générale notamment dans le cadre des transfusions sanguines.

Pratiquement tous les patients vMCJ étaient homozygotes méthionine, suggérant **une susceptibilité particulière en fonction du codon 129** (représentant moins de 40% de la population générale). À ce jour, seul un patient avéré de vMCJ est MV (Mok *et al.*, 2017) et plusieurs cas asymptomatiques (Peden *et al.*, 2004 ; Ironside *et al.*, 2006 ; Kaski *et al.*, 2009 ; Peden *et al.*, 2010). Dans des modèles murins humanisés pour la PrP^C, la neuroinvasion est efficace pour les autres codons mais avec un allongement de la durée d'incubation (Asante *et al.*, 2002).

Chez l'Homme ce phénomène est également observé avec une durée d'incubation de la maladie plus courte chez les patients homozygotes traités par hormones de croissance que chez les hétérozygotes au codon 129 (Huillard d'Aignaux *et al.*, 1999). Il est tout à fait pertinent de supposer qu'il en est de même dans le cadre de la vMCJ (Collinge *et al.*, 2006). Des études récentes mettent en évidence la présence de nouveaux polymorphismes compliquant ce schéma de susceptibilité (Mead *et al.*, 2009). De même que précédemment, on peut supposer l'apparition d'une nouvelle vague de cas non homozygote pour la méthionine.

Une autre hypothèse est qu'il y ait eu une **modification de la souche suite au changement d'espèce** (transmission inter-espèce : bovin-Homme) : certains patients infectés par l'agent de l'ESB pourraient présenter les caractéristiques d'une MCJ de forme sporadique et non celles associées à une vMCJ. En effet, l'exposition expérimentale inter-espèce conduit à des modifications du profil électrophorétique de la PrP^{res} (Asante *et al.*, 2002 ; Espinosa *et al.*, 2009). Asante et ses collaborateurs ont observé des profils biochimiques indistinguables entre les formes sporadiques et de vMCJ chez des souris infectées par l'agent de l'ESB (Asante *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que parmi les patients atteints de forme sporadique un certain nombre aient en fait été contaminés par l'agent de l'ESB. Cela impliquerait que le nombre de cas de vMCJ soit sous-estimé. Ce phénomène est également observé avec la souche expérimentale 87A sujette à des modifications de stabilité en fonction de la dose (Bruce et Dickinson, 1979 ; Bruce et Dickinson, 1987).

Au total, 228 patients atteints de vMCJ sont directement liés à l'ingestion de produits bovins contaminés. Les dernières données épidémiologiques font état d'un déclin de l'incidence de l'ESB et de la vMCJ chez l'Homme. La barrière d'espèce bovin-Homme semble donc difficile à franchir. Les mesures prophylactiques, en vigueur, de prévention contre l'agent de l'ESB participent ainsi à limiter la réémergence de la forme classique de l'ESB.

Cependant, cela n'exclue pas la persistance des cas de bovins sporadiques. De plus, la forte prévalence de porteurs asymptomatiques contenue dans la population générale associée à l'absence de technique *ante mortem* de détection de l'agent infectieux contribuent au risque en termes de santé publique, et justifient le maintien des mesures de précaution, d'autant plus que trois cas de vMCJ post-transfusionnelles ont été rapportés au RU.

Chapitre II : Analyse du risque de transmission secondaire de la vMCJ

Même si le risque de transmission de l'ESB à l'Homme par voie orale semble maîtrisé, il persiste actuellement un risque de santé publique lié à la transmission iatrogène de la vMCJ par transfusion sanguine. Le risque réside dans la présence de l'agent infectieux dans le sang au moment du don. Il est d'autant plus difficile à évaluer en l'absence de test de dépistage. Contrairement au risque primaire, la transmission inter-humaine, via le sang ou ses dérivés, pourrait s'avérer beaucoup plus aisée dans la mesure où l'agent infectieux est d'ores et déjà adapté à son hôte. La transmission tertiaire est exclue car il est impossible de donner son sang lorsque l'on a été receveur. D'après l'OMS, 112,5 millions d'unités de sang¹⁴ sont collectées dans le monde par an, et 79% des patients transfusés ont plus de 60 ans (www.who.int). Cette même source recommande de restreindre au maximum les actes de transfusion afin de garantir la sécurisation des patients.

À ce jour, les seuls cas post-transfusionnels sont issus de la transmission de l'agent de la vMCJ. Concernant la forme sporadique, ce risque de contamination secondaire est considéré comme théorique (*Rapport de novembre 2007 de l'Afssaps*). En effet, aucune donnée n'a permis d'établir clairement un lien entre l'apparition d'une forme sporadique de MCJ et un antécédent transfusionnel. De plus dans les formes sporadiques, la distribution tissulaire de l'infectiosité est moins élevée par rapport à la vMCJ. Toutefois, face à la plus forte incidence de ces formes, il convient d'appliquer le principe de précaution. D'ailleurs, l'ensemble des lots contenant des plasmas issus de personnes ayant développé *a posteriori* une MCJ sporadique ou génétique est rappelé.

1- Prionémie : infectiosité dans le sang

1.1 Présentation des transmissions expérimentales princeps

Différentes expériences ont mis en évidence la **présence d'infectiosité dans le sang et ses dérivés**. Chez les rongeurs, l'injection intracérébrale de produits sanguins issus d'animaux préalablement infectés avec une souche de tremblante est capable d'induire une EST chez la souris et le hamster (*Diringer, 1984 ; Casaccia et al., 1989*). L'infectiosité a également été retrouvée en utilisant des souches de prions humaines (*Brown et al., 1999 ; Cervenakova et al., 2003*). En 2003, Cervenakova et ses collaborateurs ont initialement inoculé par voie intracérébrale des souris avec deux souches humaines adaptées (vMCJ et GSS) (*Cervenakova et al., 2003*). En phase préclinique et symptomatique, le sang de ces animaux a été prélevé puis inoculé (par voies intracérébrale et intraveineuse) à d'autres souris saines qui développeront une EST. Cette étude met en évidence la présence d'infectiosité dans le sang d'animaux en phase symptomatique ainsi que préclinique.

Dans cette même étude, les auteurs soulignent que **l'inoculation de plasma infectieux par voie intraveineuse est efficace** pour transmettre une maladie à prion, et serait même plus efficace que la voie intracérébrale (*Cervenakova et al., 2003*). Les inoculations intraveineuses sont généralement réalisées chez le mouton ou les PNH car ils offrent l'avantage de pouvoir utiliser des volumes équivalents à ceux employés chez l'Homme.

¹⁴ Une unité, ou poche, de sang chez l'adulte correspond à environ 450 ml (soit moins de 10% du volume total).

Dès 2000, les travaux de Houston et son équipe soulignent que l'infectiosité est présente dans le sang de moutons exposés à des souches de tremblante ou d'ESB (Houston *et al.*, 2000 ; Hunter *et al.*, 2002). Ils ont mis en évidence la possibilité de transmettre une maladie à prion chez un mouton sain par transfusion de sang total, provenant de moutons en phase asymptomatique. Ces données ont été cruciales dans la prise en compte du risque de transmission iatrogène via le sang. Les derniers résultats de cette étude indiquent que les taux de transmission après transfusion chez le mouton sont de 43% avec la tremblante naturelle et de 36% avec l'ESB (Houston *et al.*, 2008).

Le modèle du macaque cynomolgus est également permissif à l'ESB et la vMCJ par voie intraveineuse (Herzog *et al.*, 2004 ; Lacroux *et al.*, 2014 ; McDowell *et al.*, 2015 ; Lescoutra-Etcheagaray *et al.*, 2015). Dans ce modèle des durées d'incubation similaires ont été observées suite à des expositions de l'ESB par voies intracérébrale et intraveineuse, suggérant une forte efficacité de transmission de l'infectiosité par voie intraveineuse (Herzog *et al.*, 2004).

1.2 Détermination de la charge infectieuse

Chez la souris, la dose infectieuse (DI) est comprise entre 10 et 20 par ml de sang, voire 5 DI/ ml lors de la phase préclinique, et peut augmenter jusqu'à 110 DI/ml au stade terminal de la maladie (Brown, 2005). Dans la même espèce, les titres infectieux seraient compris entre 20 à 30 unités infectieuses intracérébrales par millilitre de sang¹⁵ total durant la phase préclinique de la maladie (Cervenakova *et al.*, 2003). Ainsi, l'infectiosité présente dans le sang (prionémie) est moins importante que celle contenue dans le cerveau, mais pour autant suffisante pour transmettre la maladie. De plus, il est important de résonner en termes de volume : chez l'Homme, une transfusion de 200 ml correspond donc à 1000 DI/ ml potentielle (pour la valeur la plus faible de 5 DI/ ml) (Brown, 2005).

Différentes équipes ont développé des outils de détection de la PrP anormale dans le sang issu de macaques et de moutons en phase clinique de vMCJ (Lacroux *et al.*, 2014) ainsi que chez l'Homme (Edgeworth *et al.*, 2011 ; Bougard *et al.*, 2016). L'équipe de Caughey a mis au point une technique de détection de la PrP anormale dans le sang de hamsters en phase préclinique (Orrú *et al.*, 2011). Cette technique, appelée eQuIC (*enhanced* QuIC), intègre une étape d'immunoprécipitation permettant d'une part de concentrer la PrP en augmentant ainsi la sensibilité et d'autre part d'isoler spécifiquement la PrP et donc de s'affranchir des inhibiteurs sanguins non compatibles avec cette technique d'amplification. En parallèle, d'autres études ont mis en évidence la présence d'infectiosité dans le sang de souris infectées avec une souche de vMCJ adaptée en phases préclinique et symptomatique (Saá *et al.*, 2014). Très récemment, les travaux de Bougard et son équipe ont mis en évidence une détection grâce à la PMCA de la présence de PrP anormale dans le sang de patient vMCJ (Bougard *et al.*, 2016). Ce test a également permis l'identification de deux patients en phase préclinique 1,3 et 2,6 ans avant l'apparition des premiers signes cliniques.

Pour l'heure, ces techniques ne sont pas appliquées en routine. Mais ces nouvelles données suggèrent que la PMCA pourrait devenir une technique de détection des individus asymptomatiques lors des dons de sang afin de limiter le risque de transmission de la vMCJ par transfusion sanguine.

¹⁵ Une unité infectieuse est définie comme la quantité minimale d'infectiosité susceptible de transmettre la maladie à un animal pour une voie donnée.

1.3 Détermination de la distribution cellulaire de l'infectiosité

Comme décrit précédemment, la PrP^C est exprimée dans les cellules sanguines ce qui permet à l'infectiosité de pouvoir circuler dans le sang (Politopoulou *et al.*, 2000 ; Robertson *et al.*, 2006 ; Panigaj *et al.*, 2011). De plus, la PrP^C et, par extension, la PrP anormale ont la capacité de passer la BHE (Banks *et al.*, 2004 ; Banks *et al.*, 2009).

Au niveau cellulaire, il a été montré que la prionémie est contenue dans tous les compartiments sanguins (GR, GB, plaquettes et plasma). Ces données soulignent la pertinence des mesures de sécurisation des actes transfusionnels prises visant à déleucocyter systématiquement les dons.

Grâce à un fractionnement sub-cellulaire d'un pool de sang issu de différents hamsters en phase clinique préalablement exposés à la souche 263K, Holada et son équipe ont pu déterminer que l'infectiosité était majoritairement retrouvée dans les leucocytes, puis dans le plasma et enfin en moins grande quantité dans les plaquettes (Holada *et al.*, 2002). Par la suite, il a été proposé que l'infectiosité soit répartie de la façon suivante : 33% dans la fraction leucocytaire (globules blancs et plaquettes, *buffy coat* en anglais) et 50% dans le plasma (Gregori *et al.*, 2004 ; Gregori *et al.*, 2006). En 2010, les travaux de Mathiason et son équipe ont révélé la présence d'infectiosité dans le sang provenant de cervidés (cerf de Virginie) infectés expérimentalement par le CWD (Mathiason *et al.*, 2010). Cette étude a également mis en avant que la plus grande partie de l'infectiosité est retrouvée dans la fraction plaquettaire.

Ainsi, la répartition de l'infectiosité dans les différents composants du sang diffère selon les modèles d'étude, la souche expérimentale utilisée et les techniques de fractionnement employées. L'une des explications pourrait être liée à la difficulté de détecter l'infectiosité dans le sang au vu du masquage par certains composants sanguins (Abdel-Haq, 2015) et de l'interférence des immunoglobulines avec l'agent infectieux (Properzi *et al.*, 2015).

2- Épidémiologie descriptive des transmissions iatrogènes de vMCJ

À ce jour, les patients vMCJ post-transfusionnels ont seulement été décrits au RU. Dans ce pays, une instance veille à la surveillance épidémiologique des cas de MCJ (*National Creutzfeldt Jakob Disease Surveillance Unit*, NCJDSU) et une seconde à la sécurisation des dons de sang (*United Kingdom Blood services*). Un projet collaboratif entre ces deux services a été créé (*Transfusion Medicine Epidemiology Review*, TMER) afin d'évaluer les patients MCJ pouvant avoir été transmis suite à des actes transfusionnels.

2.1 Trois cas britanniques de transmission transfusionnelle de la vMCJ

Au total, trois cas vMCJ secondaires à une transfusion sanguine ont été recensés (Tableau 10). Ils ont tous été transfusés avant l'application des mesures de sécurisation du sang, c'est-à-dire avec des concentrés de globules rouges non déleucocytés. Pour les trois patients, les signes cliniques étaient évocateurs d'une MCJ et correspondaient à ceux décrits pour les patients vMCJ associés au risque primaire. La période d'incubation est d'environ 7 ans (délai entre la date de la transfusion et le développement des premiers signes cliniques).

Tableau 10 : Présentation des trois cas transfusionnels

	Numéro des cas	1	2	3
Informations sur les donneurs	Sexe/ âge	Homme/ 62 ans	Homme/ 31 ans	
	Période entre le don et l'apparition des signes cliniques de vMCJ	42 mois	20 mois	17 mois
Informations sur les receveurs	Date de l'acte transfusionnel <i>(concentré de globules rouges non déleucocyté)</i>	1996	1997	1997
	Période entre l'acte transfusionnel et premiers signes cliniques	6.5 ans	8 ans	8.4 ans
	Date du décès <i>(âge au moment du décès)</i>	2003 (70 ans)	2005 (32 ans)	2007
	Période entre l'acte transfusionnel et le décès	7.5 ans	8.8 ans	9.5 ans
	Génotype au codon 129	M/M	M/M	M/M
Références	Llewelyn <i>et al.</i> , 2004	Wroe <i>et al.</i> , 2006	Health Protection Agency. 2007. (www.hpa.org.uk)	

Les principales informations, détaillées dans le tableau 10, sur ces trois patients sont les suivantes :

- Le cas numéro 1 a été notifié en décembre 2003 (Llewelyn *et al.*, 2004). Des phases de dépression et des troubles visuels ont été rapportés. Aucun signe de pulvinar ni d'anomalie pour la protéine 14-3-3 n'ont été mis en avant. L'analyse *post-mortem* a mis en évidence la présence de plaques florides et de PrP anormale de type 2B, caractéristique de l'agent de la vMCJ.
- Le cas numéro 2 a été rapporté en février 2006 (Wroe *et al.*, 2006). Ce patient présentait des troubles de l'attention ainsi que des atteintes motrices (résultats IRM et LCR normaux). L'analyse *post-mortem* souligne la présence de PrP anormale de type 4, signe d'une vMCJ, dans le cerveau et les organes lymphoïdes.
- Le cas numéro 3 a été rapporté en janvier 2007 soit huit ans après avoir été transfusé (www.hpa.org.uk). Ce patient a reçu un concentré de globules rouges non déleucocyté provenant du même donneur que le cas numéro 2.

À ce jour, les trois patients sont décédés, et étaient tous homozygotes méthionine au codon 129.

2.2 Deux cas de porteurs asymptomatiques post-transfusionnels

Au RU, il a été mis en évidence que 18 patients vMCJ britanniques avaient donné leur sang avant de présenter les premiers signes cliniques de la maladie. L'enquête épidémiologique a permis de relier ces 18 dons avec 67 actes transfusionnels (Tableau 11) (Reesink *et al.*, 2003 ; Urwin *et al.*, 2016). L'âge médian des receveurs est de 68 ans (de 57 à 79 ans). En 2016, 14 d'entre eux étaient toujours vivants (Urwin *et al.*, 2016). Une étude rétrospective menée sur 33 de ces receveurs décédés a souligné qu'aucun d'entre eux ne présentait de signes cliniques suggérant une vMCJ (Gillies *et al.*, 2009). Toutefois, aucun tissu lymphoïde ni cérébral n'était disponible, et n'a été analysé afin de détecter une éventuelle PrP anormale. Ainsi, la possibilité que ces patients aient été des porteurs asymptomatiques ne peut être exclue.

Tableau 11 : Nombre de patients MCJ ayant donné leur sang au Royaume-Uni avant le déclenchement des premiers signes cliniques (www.cjd.ed.ac.uk).

Donneur	Nombre de donneurs avérés (Après 1980)	Nombre de receveurs identifiés
vCJD	18 ¹	67
sCJD	29	211
iCJD	17	50

¹Au total, 24 patients vMCJ ont été identifiés comme donneurs de sang. Toutefois, seuls 18 produits sanguins ont été identifiés comme ayant été réellement délivrés aux hôpitaux.

Parmi cette cohorte de receveurs de produits sanguins labiles, deux individus sont porteurs de PrP anormale dans les tissus périphériques avec un génotype non homozygotes méthionine MM au codon 129 (Peden *et al.*, 2004 ; Peden *et al.*, 2010). Aucun d'entre eux n'a été comptabilisé dans les cas de vMCJ dans la mesure où ils n'ont pas développé de signes cliniques évocateurs d'une maladie neurodégénérative. Les principales informations, détaillées dans le tableau 12, sur ces deux patients sont les suivantes :

- Le cas numéro 1 a été décrit par Peden et ses collaborateurs en 2004 (Peden *et al.*, 2004). Ils rapportent le décès d'une patiente transfusée avec du sang infectieux cinq ans auparavant. L'étude génétique révèle qu'elle était hétérozygote sur le codon 129 (MV). L'analyse *post-mortem* souligne la présence de PrP anormale dans la rate mais pas dans le cerveau (Peden *et al.*, 2004 ; Wadsworth *et al.*, 2011). En 2013, Bishop et son équipe mettent en évidence que la rate de cet individu est infectieuse, et capable d'induire une EST chez la souris (Bishop *et al.*, 2013), contrairement à l'injection de l'homogénat de cerveau qui n'a pas réussi à transmettre de maladie. Ainsi, au vu du génotype, il est possible d'émettre l'hypothèse que ce dernier a influencé la période d'incubation, et que cet individu était en phase d'incubation.
- Le cas numéro 2 (patient hémophile) a été rapporté par les autorités britanniques en 2009. En 2010, Peden et ses collaborateurs mettent en évidence la présence de PrP anormale dans la rate de ce patient de génotype hétérozygote (MV) (Peden *et al.*, 2010). Il a reçu deux doses de facteur VIII (une première en 1994 et une seconde en 1996) préparés à partir de plasma d'un donneur ayant développé une vMCJ plusieurs mois après le don.

La description du cas numéro 2 est la première à mettre en évidence une accumulation de PrP anormale dans la rate d'un patient hémophile, et de façon plus large d'un patient traité avec des médicaments dérivés du sang (MDS, produits sanguins stables). Toutefois, pour ce patient différents facteurs de risques d'exposition à l'agent de la vMCJ ont été rapportés : (i) un risque primaire comme l'ensemble de la population britannique exposée entre 1980 et 1996 (ii) des transfusions répétées (iii) des actes médicaux invasifs tels qu'une endoscopie (bien que non considérée à risque). Il n'en demeure pas moins qu'un marquage caractéristique de vMCJ a été mis en évidence dans la rate de cet individu. À ce jour, aucune information sur l'infectiosité de cet échantillon n'a été fournie.

Tableau 12 : Présentation des deux porteurs asymptomatiques secondaires à des actes transfusionnels

Numéro des cas	1	2
Date de l'acte transfusionnel incriminé	1999	1994 et 1996 (Deux doses de facteurs VIII)
Date du décès	2004 ¹	2009 ²
Détection <i>post-mortem</i> de PrP anormale	Rate et ganglions lymphatiques	Rate
Présence d'infectiosité	Rate infectieuse	Aucune information
Codon 129	M/V	M/V
Références	Peden <i>et al.</i> , 2004	Peden <i>et al.</i> , 2010

¹ Le patient est décédé d'une crise cardiaque.
² Le patient est décédé sans signe neurologique associé à une vMCJ.

Ainsi, aucun cas avéré de vMCJ n'a été identifié suite à l'exposition de produits sanguins stables, et le risque de transmission associé à l'utilisation de MDS est considéré comme théorique. En France, six sources de facteurs VIII (quatre facteurs recombinants et deux plasmatisés) sont disponibles pour le traitement de l'hémophilie A¹⁶. ([Rapport établi par l'Afssaps en 2009](#)).

2.3 D'autres cas non détectés ?

En France, aucun cas post-transfusionnel de vMCJ n'a été recensé. Toutefois les données épidémiologiques font état de trois patients ayant donné leur sang parmi les 27 cas français. Au total, 38 receveurs ont été identifiés entre 1991 et 2004. En 2009, 27 d'entre eux étaient décédés de cause non liée à une maladie neurodégénérative (à l'exception d'un cas où les causes du décès n'ont pas pu être identifiées). Parmi les 11 individus vivants, quatre ont été perdus de vue et sept ont et/ ou font encore l'objet d'un suivi par la cellule nationale de référence française.

Informers les patients souligne un problème éthique face à l'absence : (i) de certitudes sur leur devenir clinique et (ii) de stratégie thérapeutique à leur proposer.

Au Royaume-Uni, dix cas de vMCJ primaires avaient subi des actes transfusionnels bien avant qu'ils ne déclenchent la maladie ([Davidson et al., 2014](#) ; www.cjd.ed.ac.uk). Il est donc envisageable d'émettre l'hypothèse que certains de ces patients soient liés à une contamination secondaire et non directement suite à l'ingestion de viande contaminée. Cette théorie est accentuée par l'absence de critères de distinction de la vMCJ primaire d'une transmission inter-humaine secondaire (absence de différences en termes de typage moléculaire, anatomopathologique et lésionnelle). Concernant les cas sporadiques de MCJ secondaires à des transfusions sanguines, les travaux de Puopolo et ses collaborateurs soulignent un risque de contamination non confirmé par d'autres travaux ([Puopolo et al., 2011](#) ; [Molesworth et al., 2011](#)). Le dernier modèle mathématique de prédiction du nombre de cas secondaires à venir se veut rassurant grâce aux mesures de sécurisations des actes transfusionnels en vigueur ([Yang et al., 2017](#)).

3- Mesures générales de prévention et gestion du risque transfusionnelle

À l'instar du risque primaire, une série de mesure a été prise pour la sécurisation des actes transfusionnels en France, et dans les autres pays développés tels que le RU. Ces mesures ont été appliquées avant même la mise en évidence des premiers cas de vMCJ transfusionnels.

3.1 Mise en place d'une traçabilité

Suite à la contamination accidentelle de poches de sang par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), un renforcement des mesures a été instauré avec la mise en place de **différents acteurs impliqués dans la sécurisation** des actes transfusionnels et d'**un système de traçabilité** des dons.

Le personnel habilité de l'Établissement Français du Sang (EFS) attribue un numéro à chaque don de sang. En parallèle, l'InVS assure une veille sanitaire en tenant à jour des registres répertoriant différentes informations sur le donneur tel que l'âge, le type et nombre de dons, les résultats des différents tests de dépistage ainsi que le nombre de lots et de receveurs.

¹⁶ Depuis 2008, plus de 80% des facteurs coagulants utilisés dans le traitement de l'hémophilie A sont issues de fractions recombinantes ne présentant pas de risque de vMCJ.

Ces données épidémiologiques facilitent l'enquête en cas d'incrimination d'un don afin d'établir rapidement un lien entre le donneur et les différents dons. La traçabilité est considérée comme complète car il est possible de remonter du receveur au lot jusqu'au donneur et inversement.

Ainsi, entre 1992 et 1998, les lots issus de donneurs ayant développé ultérieurement une MCJ sporadique, familiale, vMCJ ou ayant été traités par hormones de croissance ont été rappelés et détruits (Lefrère, 2007).

3.2 Critères d'inclusion et d'exclusion des donneurs

La sécurisation transfusionnelle commence en amont du prélèvement sanguin par **la sélection des donneurs**. Ces derniers doivent être volontaires et non rémunérés. Au cours de l'entretien médical précédant la collecte de sang, les individus doivent répondre à un questionnaire d'inclusion et d'exclusion national. La figure 17 présente les questions spécifiques à la gestion du risque transfusionnel lié aux maladies à prions afin d'exclure systématiquement les individus présentant des facteurs de risques liés aux ESTs.

21	Avez-vous séjourné (plus d'un an cumulé) au Royaume-Uni entre 1980 et 1996 ?	<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Je ne sais pas
Au cours de votre vie				
33	Avez-vous déjà reçu une transfusion sanguine ou une greffe d'organe ?	<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Je ne sais pas
34	Avez-vous eu une greffe de cornée ou de dure-mère ?	<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Je ne sais pas
35	Avez-vous reçu un traitement par hormone de croissance avant 1989 ?	<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Je ne sais pas
36	Un membre de votre famille a-t-il été atteint d'une maladie de Creutzfeldt-Jakob, maladie de Gertsmann-Sträussler-Scheinker, insomnie fatale familiale ?	<input type="radio"/> Oui	<input type="radio"/> Non	<input type="radio"/> Je ne sais pas

Figure 17 : Questionnaire français Pré-don établi par l'EFS (www.dondesang.efs.sante.fr).

En France sont donc exclus du don du sang les patients ayant été traités avec des injections d'hormone de croissance, ayant eu une exploration invasive du SNC, des antécédents familiaux de maladies à prions ou encore ayant séjourné au RU plus d'un an cumulé lors de la période à risque (Lefrère et Hewitt 2009). Depuis 1997, les donneurs antérieurement transfusés sont également exclus afin d'éliminer le risque de contamination tertiaire (Tableau 13).

Tableau 13 : Principales mesures d'exclusion des donneurs de sang en France.

Dates	Mesures d'exclusion des donneurs
1992	Traités aux hormones de croissance extractives
1993	Ayant des antécédents familiaux de MCJ
1995	Ayant subi une intervention neurochirurgicale
1997	Ayant reçu une greffe de cornée, dure-mère
1997	Antérieurement transfusés
2001	Ayant séjourné plus d'un an cumulé au Royaume-Uni entre 1980 - 1996

3.3 La leucoréduction

Les mesures de sécurisation des actes transfusionnels ont conduit à éliminer **spécifiquement les globules blancs du sang total** à l'aide de filtres (Prowse et al., 1999). Initialement, ce processus a été instauré afin de réduire les risques transfusionnels viraux et prévenir l'allo-immunisation (notamment anti-HLA). Dans le cadre des ESTs, il a été montré que la leucoréduction réduisait de 42% l'infectiosité présente dans le sang (Gregori et al., 2004).

Certains auteurs soulignent que ce processus n'est pas entièrement efficace puisque l'infectiosité est toujours contenue dans le plasma (Prowse et Bailey, 2000).

La leucoréduction est généralisée dans l'ensemble des pays européens ainsi qu'au Canada. En France, la leucoréduction est étendue aux médicaments dérivés du sang (Foster *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2000). Les autorités canadiennes sont allées plus loin en excluant les dons de sang des personnes ayant séjourné six mois ou plus en France et au RU entre 1980 et 1996.

Depuis 2002, le RU a mis en place des mesures drastiques en important du plasma frais congelé pour les receveurs nés à compter du 1^{er} janvier 1996 et donc considérés comme exempts de risque de contamination vMCJ primaire (Vamvakas, 2011).

3.4 Les autres mesures

Expérimentalement différents **filtres anti-prion** ont été évalués afin de pallier l'absence de technique permettant de détecter l'infectiosité dans le sang. L'objectif est de maintenir l'intégrité des composants sanguins tout en retenant les prions circulants dans le sang. Bien que non appliqués en routine, ils ont démontré leur efficacité *in vivo* (Saunders *et al.*, 2005 ; Sowemimo-Coker *et al.*, 2005 ; Lescoutra-Etchegaray *et al.*, 2014) ainsi que leur biocompatibilité chez l'Homme (Cahill *et al.*, 2010).

Chez le macaque cynomolgus, l'utilisation de filtres anti-prion permet d'allonger la durée de vie des individus transfusés en comparaison de ceux ayant reçu des concentrés de globules rouges non filtrés (Lescoutra-Etchegaray *et al.*, 2015). Les éléments en défaveur d'une application en routine chez l'Homme sont d'une part l'altération des concentrés de GR (pour certains filtres) et d'autre part son coût important. Une étude irlandaise a estimé que l'ajout de ces filtres en routine représenterait un budget d'environ 50 millions d'euros sur une période de cinq ans (Teljeur *et al.*, 2012). De plus, certains auteurs soulignent que ces filtres ne sont pas pleinement efficaces et nécessiteraient d'autres mises au point (McCutcheon *et al.*, 2015 ; McLeod *et al.*, 2015).

Concernant les MDS issus du plasma, non considéré comme présentant un risque prion, des techniques de purification, de traitements thermiques et chimiques ont été mises en place afin de limiter les risques de transmission du VIH et VHC (Keeling, Tait, et Makris, 2008). **Ces procédés de préparation** du sang sont en faveur de la diminution de l'infectiosité, notamment les étapes d'inactivation virale incluant des solvants et des détergents. Depuis 2001 en France, une étape de **nanofiltration** est ajoutée pour certains facteurs (VIII, IX et les immunoglobulines) (Figure 18). La nanofiltration permet d'éliminer certains virus ainsi que les prions en fonction de la taille des pores utilisés (Cardone *et al.*, 2012). En parallèle, les lots fabriqués à partir de plasma issu d'un don de patient vMCJ ont été rappelés et détruits. Une autre alternative tend de plus en plus à être appliquée : **l'utilisation de facteurs recombinants**. L'objectif serait d'accéder à une absence d'utilisation de sang humain tout en maintenant leurs effets thérapeutiques pour le patient. Toutefois, certains patients hémophiles sont intolérants à ces traitements.

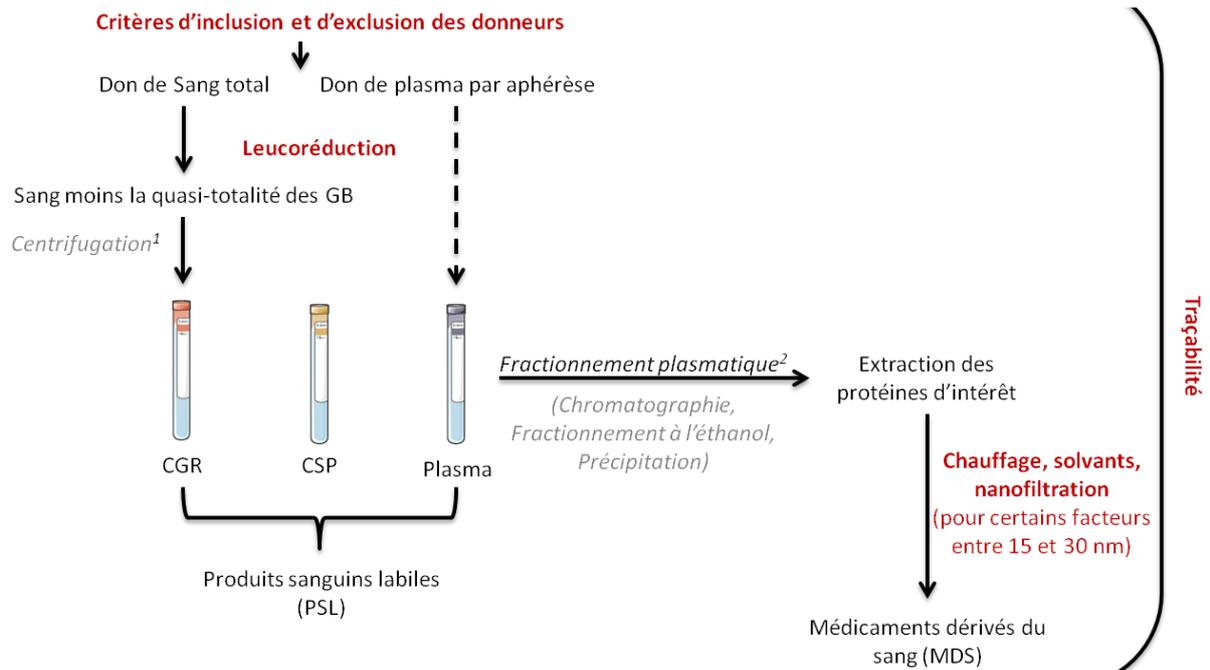


Figure 18 : Principales mesures de sécurisation des dons de sang.

Les principales étapes de sécurisation du sang au regard du risque prion sont en rouge : critères d'inclusion et d'exclusion des donneurs, traçabilité tout au long du processus, leucoréduction et procédés de fabrication des médicaments dérivés du sang tels que la nanofiltration sur des membranes d'une porosité de moins de 75 nm. En France, la centrifugation du sang total est faite par l'EFS et le centre de fractionnement par le LFB. CGR : Concentrés de globules rouges. CSP : Concentré standard de plaquette. EFS : établissement français du sang. LFB : laboratoire français du fractionnement.

Dès que le caractère transmissible des ESTs a été mis en avant, l'évaluation du risque transfusionnel a été considérée. Les pays présentant le plus fort risque en termes de transmission secondaire sont les pays développés ayant été fortement exposés à l'ESB. Les hémophiles représentent la population la plus à risque puisqu'ils peuvent bénéficier de nombreuses transfusions sanguines au cours de leur vie. Actuellement, trois cas de transmissions de la vMCJ par transfusion sanguine ont été décrits au RU et aucun en France, auxquels se rajoutent deux cas de contamination sans développement clinique de la maladie. La limitation du risque repose notamment sur les critères restrictifs d'exclusion et d'inclusion des donneurs de sang et la leucoréduction systématique des dons. Ces mesures de prévention se justifient par l'absence de technique d'élimination systématique de l'agent.

Troisième partie :

Outils d'étude de la réplication dans les maladies à prions

Cette partie n'a pas vocation à faire un état de l'art de l'ensemble des techniques disponibles pour l'étude des maladies à prions, mais se concentre sur les principales méthodes mettant en évidence une réplication de la PrP anormale.

La technique de référence pour le diagnostic des maladies à prions reste l'histologie. Elle est utilisée notamment lors de l'examen neuropathologique *post-mortem*, pour confirmer les suspicions posées *ante-mortem* sur la base des techniques indirectes (l'analyse de la protéine 14-3-3 dans le LCR, reflet d'une souffrance cellulaire, l'IRM ainsi que l'EEG)¹⁷. L'histologie offre l'avantage de pouvoir visualiser la triade lésionnelle (gliose, perte neuronale et spongiose). En effet, il est possible d'observer, par coloration en HE, le caractère spongieux du tissu cérébral et par immunomarquages les dépôts anormaux de PrP.

Dans la majorité des cas, **les techniques de détection nécessitent une étape initiale de préparation de l'échantillon** basée sur la digestion enzymatique par la PK ou la dénaturation par des agents chaotropes. Elles reposent, respectivement, sur les propriétés particulières de la PrP anormale à savoir sa résistance partielle à la protéolyse et son insolubilité dans les détergents. L'objectif est de distinguer la PrP anormale de son isoforme physiologique. Dans ces conditions, la PrP^C sera éliminée tandis que la PrP anormale pourra être détectée par des techniques d'immunodétection (ELISA, WB, ...). Des méthodes alternatives ont été proposées et reposent sur l'utilisation d'anticorps conformationnels reconnaissant spécifiquement la PrP anormale (Korth et al. 1997 ; Safar et al., 1998 ; Sakudo et al., 2007).

D'autres techniques sont également utilisées et s'appuient sur l'amplification de la forme pathologique. Ces méthodes offrent l'avantage de détecter des quantités infimes de PrP anormale et de s'affranchir du seuil de détection des approches biochimiques. On peut citer les modèles de réplication acellulaires qui reposent sur sa capacité à changer de conformation et à s'agréger, et les modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces derniers offrent l'avantage de mimer la physiopathologie des maladies à prions humaines, et de mettre en avant le caractère infectieux de la souche étudiée.

¹⁷ Méthodes de diagnostic *ante mortem* (pages 14 à 16).

Chapitre I : Modèles d'amplification acellulaires

Deux modèles acellulaires d'amplification de la PrP anormale, reposant sur sa capacité d'agrégation (*seeding*), sont actuellement utilisés (Figure 19) :

- La **PMCA**, amplification cyclique de protéines mal repliées, traduit de l'anglais « *Protein Misfolding Cyclic Amplification* » ;
- La **QuIC**, conversion induite par agitation, « *Quaking-Induced Conversion* ».

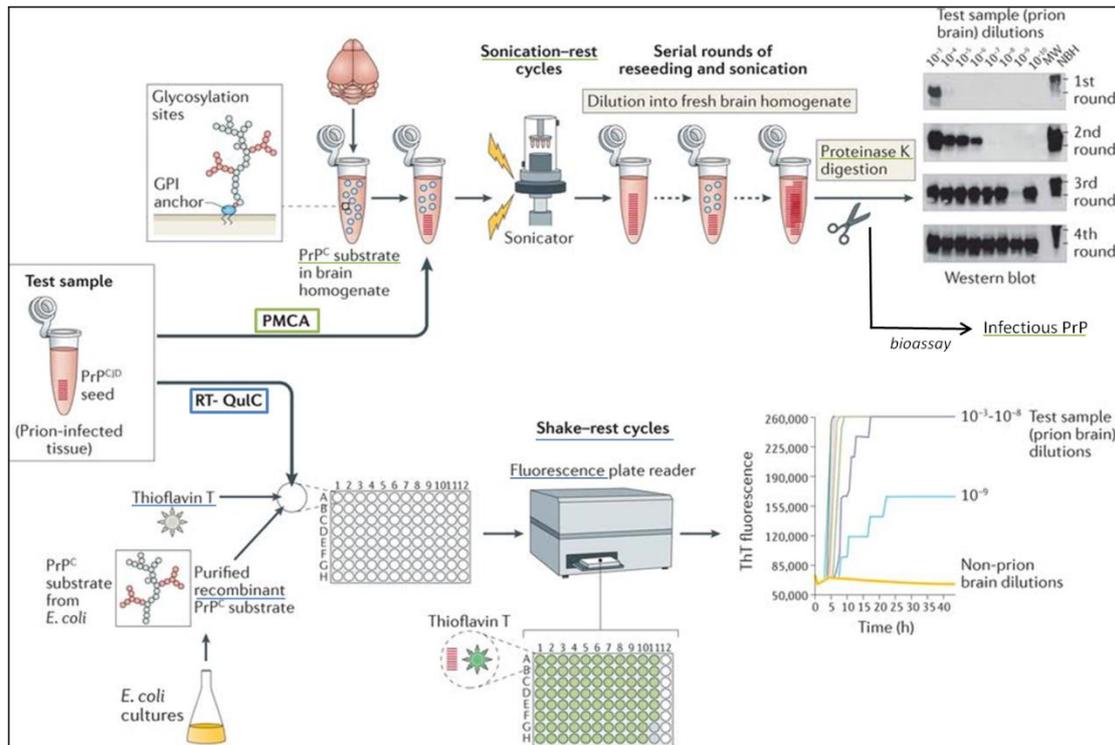


Figure 19 : Principes de fonctionnement de la PMCA et de la RT-QuIC (d'après Zanusso et al. 2016).

PMCA : protein misfolding cyclic amplification (vert). RT-QuIC : real time quaking-induced conversion (bleu).

1- La PMCA

En 2002, l'équipe de Claudio Soto a mis au point un nouveau modèle d'amplification acellulaire, la PMCA. Cette technique repose sur la mise en contact d'une faible quantité de PrP anormale avec un excès de PrP^C (contenu dans un homogénat de cerveau sain) afin de forcer *in vitro* le phénomène de conversion (Soto, Saborio, et Anderes, 2002) (Figure 19). Cette étape est suivie par une alternance de cycles comprenant chacun deux phases : une première de **sonication** par ultrasons et une seconde d'**incubation**. La sonication permettrait d'augmenter le nombre de noyau de nucléation conduisant à une plus grande quantité de PrP anormale. Cette isoforme ainsi libérée pourra se répliquer, en transconformant la PrP^C, durant les phases d'incubation. À la fin de chaque cycle le nombre de polymères générés augmente de façon exponentielle, sur le même principe que la PCR, *polymerase chain reaction*. La PrP^{res} néoformée conserve alors : (i) les mêmes propriétés biochimiques que celles contenues dans l'échantillon initialement ajouté dans la réaction ainsi que (ii) son caractère infectieux confirmé par bioessai (Castilla et al., 2005). La PMCA permet donc de mimer *in vitro* la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc}, et d'étudier les phénomènes de barrière d'espèces et de souche.

Depuis le développement du protocole de PMCA, différentes applications ont vu le jour. On peut citer par exemple son utilisation dans la comparaison de plusieurs procédés 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). Cette étude récente a permis de détecter grâce à l'analyse du LCR deux patients en phase asymptomatique qui ont entre 15 et 30 mois après développés des signes cliniques. Dernièrement, l'équipe de Soto a réussi à détecter la PrP^{VMCJ} dans le sang avec 100% de spécificité et de sensibilité (Concha-Marambio *et al.*, 2016). La preuve de concept avait déjà été mise en avant dans le sang d'hamster en phase symptomatique (Castilla *et al.*, 2005) et asymptomatique (Saá, Castilla, et Soto, 2006). Toutefois, cette technique ne permet pas d'amplifier les souches sporadiques.

2- La QuIC

En 2008, l'équipe de Caughey a mis au point une technique similaire à la PMCA : la QuIC (Atarashi *et al.* 2008).

Le substrat utilisé n'est plus de la PrP^C comme pour la PMCA, mais une PrP recombinante (Figure 18). Au cours de l'étape initiale de mise en contact de l'échantillon (contenant la PrP anormale d'intérêt) avec la PrP recombinante, un colorant fluorescent est ajouté : **la thioflavine T**. Le principe repose sur la capacité de la PrP anormale à s'agréger sous forme amyloïde qui sera quantifiée de façon automatisée en fluorescence grâce à la thioflavine T qui se fixe spécifiquement aux dépôts amyloïdes. L'étape de sonication, jugée sujette à des variations d'une expérience à l'autre, est remplacée par différents cycles d'agitations (Atarashi *et al.*, 2008). La QuIC est présentée comme plus simple à mettre en place au sein d'un laboratoire, et conférant des résultats reproductibles d'une équipe à l'autre (Atarashi *et al.*, 2008). Contrairement à la PMCA, aucune infectiosité n'est produite ni amplifiée ce qui est tout à fait compatible avec un usage en routine dans le milieu hospitalier.

Ainsi, une partie des recherches est axée sur l'utilisation de la QuIC comme technique de diagnostic dans le LCR de patients atteint de MCJ sporadique (Atarashi *et al.*, 2011 ; McGuire *et al.*, 2012) voire directement à partir de prélèvements de la cavité nasale (Orrú *et al.*, 2014). Afin de valider la pertinence de cette technique, une étude internationale a été menée sur des échantillons de LCR provenant de patients atteints de forme sporadique de MCJ ou d'autres maladies neurologiques (McGuire *et al.*, 2016 ; Cramm *et al.*, 2016). Les premiers résultats de cette étude indiquaient l'importance d'utiliser des lots fiables de PrP recombinante (Cramm *et al.*, 2015). Les dernières données publiées en 2016 mettent en évidence une spécificité de 100% sur les 15 patients testés par 12 équipes de recherche différentes (McGuire *et al.*, 2016). Ces résultats soulignent que la QuIC pourrait être utilisée dans le diagnostic humain. En parallèle, cette technique permet d'étudier les phénomènes de *seeding* du CWD dans le sang et la salive (Henderson *et al.*, 2015) ainsi que d'évaluer la stabilité de cette souche (Hannaoui *et al.*, 2017).

Ces deux techniques peuvent être considérées comme complémentaires dans la mesure où elles n'amplifient pas les mêmes souches. Ainsi, elles permettent de souligner les phénomènes d'agrégations anormaux des agents de l'ESB et de la vMCJ (PMCA) et des formes sporadiques de MCJ (QuIC). Grâce à ces modèles d'amplification *in vitro* de la PrP anormale, des découvertes prometteuses ont été réalisées ces dernières années en matière de diagnostic chez l'Homme.

Chapitre II : Les modèles animaux

Il existe une dichotomie entre le caractère résistant et infectieux d'une souche, c'est-à-dire qu'un échantillon infectieux ne contient pas nécessairement de la PrP^{res} (Lasmézas *et al.*, 1997). De nos jours, la seule façon de démontrer l'infectiosité d'une souche reste la mise en évidence de signes cliniques suite à l'injection de Prion chez l'animal. Ainsi, le bioessai demeure actuellement le « *Gold standard* » dans l'étude des maladies à prions (Watts et Prusiner, 2014).

Cette partie n'a pas vocation de décrire l'ensemble des modèles *in vivo* utilisés dans les maladies à prions. L'objectif est d'introduire succinctement les principaux modèles utilisés dans ce projet doctoral (pour revue : Brandner et Jaunmuktane, 2017).

1- Les rongeurs

Dans le cadre de l'étude des maladies à prions, le modèle animal le plus utilisé est la souris. Les principaux avantages sont résumés dans le tableau 14.

Les modèles murins permettent notamment de **caractériser expérimentalement les différentes souches de prion**. La transmission à l'animal offre également la possibilité de **mesurer l'infectiosité d'un échantillon**, c'est-à-dire de déterminer le titre infectieux grâce à des dilutions successives. La détermination du point limite est une technique de titration classiquement employée en bactériologie et virologie. Elle permet de déterminer la dose à laquelle 50% des animaux décèdent suite à l'infection (dose létale 50, DL50). De plus, il est possible de **générer des modèles transgéniques** (Tg) : souris humanisées, souris délétées pour le gène *Prnp*, *ect.*

Tableau 14 : Avantages et limites des modèles murins dans l'étude de la physiopathologie des maladies à prions

Avantages	Caractéristiques	Inconvénients
Détection des marqueurs neuropathologiques	<i>Gliose/ Spongiose/ Neurotoxicité/ Accumulation de PrP^{res}</i>	-
Etude de la pathogénèse	<i>Distribution tissulaire (réplications périphérique et centrale) en fonction de la voie d'inoculation</i>	Pertinence avec l'Homme ?
Diminution de la barrière d'espèce	<i>Génération de modèles transgéniques (PrP^{Hum}, PrP^{Ko}, d'autres espèces)</i>	Pertinence avec l'Homme ?
Caractérisation des souches	<i>Étude du taux de transmission, de la pathogénèse, ...</i>	Durée (Jusqu'à 2 ans)
Mise en évidence de l'infectiosité	<i>Calcul du titre infectieux (DL50), durée de survie</i>	Éthique Nombre de souris important en fonction des différentes dilutions réalisées
Observations du phénotype clinique	<i>Troubles moteurs, changements de comportements, amaigrissement, pelage hérissé, ...</i>	Problème éthique
Utilisation en laboratoire	<i>Adapté aux conditions de laboratoire</i>	Coûts/ Durée

Souris conventionnelles

Les souris conventionnelles sont largement utilisées afin de caractériser expérimentalement les souches de prions. Les modèles murins les plus utilisées sont : C57Bl/6 ; FVB ; RIII ; Swiss.

Toutefois, ces souris sont relativement résistantes aux souches humaines de prion (Tateishi *et al.*, 1995 ; Bruce *et al.*, 1997). Une étude récente souligne des différences en termes de période d'incubation suite à une exposition à l'agent de la vMCJ par voie IC (Diack *et al.*, 2017) : les souris RIII présentent un taux de transmission de 67% (395 ± 18 , $n = 15$) tandis que 76% des souris C57Bl/6 développent une EST avec une période d'incubation moyenne de 524 ± 20 jpe ($n = 17$). Inversement, les souris Swiss sont particulièrement sensibles à l'exposition IC de l'agent de la vMCJ avec 100% de transmission (300 ± 10 jpe, $n = 38$) (Comoy *et al.*, 2017). Afin de s'affranchir de ce phénomène de barrière de transmission, des souris transgéniques exprimant la PrP^C de l'espèce d'intérêt ont été générées.

Souris déficientes pour la PrP, PrPKo

Les principales souris délétées pour le gène *Prnp* ont été présentées dans le tableau 4¹⁸ (Büeler *et al.*, 1992 ; Manson *et al.*, 1994b ; Moore *et al.*, 1995 ; Sakaguchi *et al.*, 1996 ; Rossi *et al.*, 2001 ; Yokoyama *et al.*, 2001 ; Nuvolone *et al.*, 2016). Ces souris ont notamment permis de souligner d'une part le rôle de la PrP^C en condition physiologique, et d'autre part de confirmer sa nécessité dans le développement d'une maladie à prion. En effet, aucune d'entre elle n'est sensible à l'infection prion quelles que soient la dose, la voie d'inoculation et la souche utilisées (Büeler *et al.*, 1993). À ce jour, des souris PrPKo ont été générées à partir de presque tous les fonds génétiques murins (Brandner *et Jaunmuktane*, 2017).

Souris transgéniques humanisés, PrP^{Hu}

Grâce à l'expression de la forme humaine de la PrP^C, ces souris sont largement utilisées afin d'évaluer le risque zoonotique d'une souche, étudier les formes familiales des maladies à prions ou encore tester de nouveaux médicaments candidats. En effet, l'expression de la PrP^C humaine rend ces souris sensibles aux souches humaines de prion avec un raccourcissement de la période d'incubation et, inversement, une augmentation du taux de transmission (Telling *et al.*, 1994).

Deux principales constructions de souris humanisées sont possibles :

- **Génération de souris chimériques** : expression de la PrP^C endogène (murine) en plus de la forme humaine ;
- **Génération de souris humanisées sur un fond génétique PrPKo** : expression uniquement de la forme humaine.

Récemment, des souris présentant des constructions différentes sur le 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). Des souris *knock in*¹⁹ sont également utilisées notamment dans l'étude des formes génétiques. Ce modèle a par exemple développé spontanément une EST, transmissible à d'autres souris, grâce à l'ajout d'un gène porteur d'une mutation impliquée dans l'IFF (Jackson *et al.*, 2009) .

¹⁸ Tableau 4 : souris délétées pour le gène *Prnp* de 1992 à 2016 (page 27).

¹⁹ Souris *Knock in* : expression uniquement du gène d'intérêt dans le locus du gène cible sous le même promoteur.

Autres souris transgéniques

D'autres souris transgéniques ont été générées exprimant par exemple une PrP^C bovine, ovine, porcine ou encore de cervidé, etc. Ces différents modèles permettent d'étudier la souche d'intérêt en présence de la PrP^C associée en s'affranchissant de la barrière d'espèce.

Concernant les souris transgéniques ovines, l'un des modèles le plus utilisé dans l'étude de la transmission de la tremblante est la souris Tg338. Ces dernières présentent une surexpression de PrP ovine (allèle VRQ) huit à dix fois supérieure à celle retrouvée dans les souris conventionnelles et une absence de PrP^C endogène (Vilette *et al.*, 2001). C'est dans ce modèle que la tremblante atypique (Nor98) a été transmise expérimentalement pour la première fois (Le Dur *et al.*, 2005).

Souris immunodéficientes

Les souris immunodéficientes ont permis de souligner l'implication individuelle des différents composants du système immunitaire (Aguzzi *et al.*, 2003). Concernant les lymphocytes B, il a été décrit qu'ils avaient un rôle indirect dans le développement de la pathologie pour permettre la maturation des FDCs (Blättler *et al.*, 1997 ; Klein *et al.*, 1998 ; Montrasio *et al.*, 2001)²⁰. Inversement, les lymphocytes T ne semblent pas jouer un rôle primordial dans la pathogénèse des ESTs. En effet, les souris *nude* (déficientes pour les lymphocytes T) sont susceptibles à la tremblante par voies intracérébrale et intra-péritonéale (Mohri, Handa, et Tateishi, 1987).

La majorité des études ont été réalisées à l'aide des souris SCID (*severe combined immunodeficient mouse*) décrites pour la première fois en 1983 (Bosma, Custer, et Bosma, 1983). Ces souris présentent une mutation spontanée empêchant la recombinaison des gènes des immunoglobulines et du TCR (*T cell receptor*). Ainsi, elles ne possèdent ni lymphocyte T ni B ni de FDCs fonctionnelles. En termes d'infection ces souris sont pour la plupart d'entre elles résistantes à l'infection prion par voie périphérique (Tableau 15).

Tableau 15 : Expositions expérimentales périphérique et centrale des souris immunodéficientes SCID.

		Souches expérimentales	% transmission	Références
Voies d'exposition	Intra-cérébrale	Fukuoka-1	100%	Kitamoto <i>et al.</i> , 1991
		ME7		O'Rourke <i>et al.</i> , 1994
		C506M3		Lasmézas <i>et al.</i> , 1996
		RML		Klein <i>et al.</i> , 1997
	Intra-péritonéale	Fukuoka-1	0%	Kitamoto <i>et al.</i> , 1991
		ME7		Fraser <i>et al.</i> , 1996
		ME7 ¹	38%	Mabbott <i>et al.</i> , 2000
		C506M3	33%	Lasmézas <i>et al.</i> , 1996
		RML	25%	Klein <i>et al.</i> , 1997

ME7 – C506M3 – RML : souches de tremblante adaptées à la souris ; Fukuoka-1 : souche humaine adaptée. ¹Souris TNFa^{-/-} : absence de lymphocyte B et de cellule dendritique fonctionnelle

La forte hétérogénéité en termes de transmission peut être expliquée par la souche, la voie d'inoculation et la dose utilisée. Ces données soulignent l'importance d'un système immunitaire fonctionnel dans la pathogénèse des maladies à prions notamment dans les phases précoces de l'infection. Cette sensibilité est restaurée suite à l'ajout de cellules spléniques (Lasmézas *et al.*, 1996) ou de moelle osseuse (Fraser *et al.*, 1996).

²⁰ Le rôle des cellules dendritiques folliculaires est présenté dans les pages 42 à 43.

2- Les primates non humains

Les primates non humains (PNH) ont été largement et sont encore utilisés dans le domaine des maladies à prions. Ils offrent l'avantage de présenter de nombreuses similitudes avec l'Homme : classification phylogénétique (Figure 20), taille (ratio poids/ volume compatible avec des transfusions expérimentales), physiologie, anatomie cérébrale ainsi qu'une forte homologie de séquence avec la PrP^C humaine (Schätzl *et al.*, 1995).

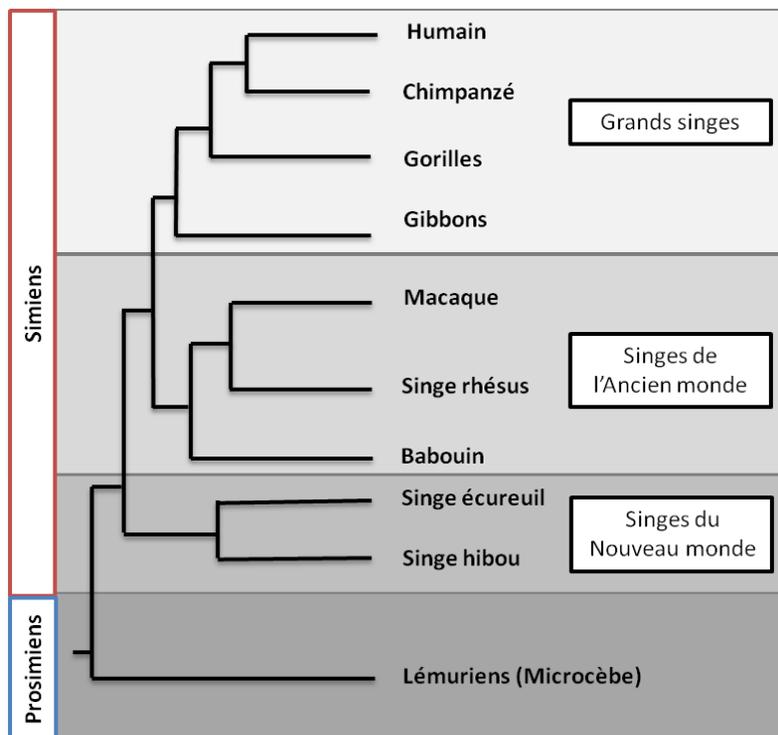


Figure 20 : Arbre phylogénétique des primates.

Le modèle historique des chimpanzés

Historiquement, ce modèle a permis d'importantes avancées scientifiques dans le domaine des maladies à prions. Grâce aux chimpanzés, Gajdusek et son équipe seront les premiers à mettre en évidence *in vivo* le caractère transmissible de l'agent responsable du Kuru (Gajdusek, Gibbs, et Alpers, 1966), qu'ils adapteront l'année suivante lors d'un second passage (Gibbs *et al.*, 1968). Les chimpanzés sont également sensibles à la MCJ sporadique humaine (Gibbs *et al.*, 1968). En 1994, une large étude a été publiée sur plus de 3000 primates confirmant le caractère transmissible de la MCJ et de deux formes familiales humaines, le GSS et l'IFF (Brown *et al.*, 1994). En résumé, les taux de transmissions observés ont été les suivants : 100% pour les formes iatrogènes, 95% pour l'agent du kuru, près de 90% pour les formes sporadiques et 68% pour les formes génétiques. De plus, différents homogénats cérébraux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de schizophrénie ou encore de sclérose en plaques ont été inoculés, toutefois seules les maladies à prions se sont avérées transmissibles. Le modèle du chimpanzé a également permis de mettre en évidence l'extrême résistance de l'agent incriminé dans les cas de contaminations iatrogènes chez l'Homme (Gibbs *et al.*, 1994).

Les PNH après l'interdiction d'utiliser les grands singes en recherche

Depuis 2000 l'utilisation des grands singes dans les protocoles de recherche est interdite, et la convention de Washington classe les PNH en fonction de leur importance en termes de danger d'extinction. Actuellement, dix espèces sont autorisées à des fins scientifiques.

Dans le cadre de l'étude des maladies à prions les espèces les plus utilisées sont :

- Le **microcèbe**, *Microcebus murinus* ;
- Le **singe écreuil**, *Saimiri sciureus* ;
- Le **macaque cynomolgus**, *Macaca fascicularis*.

Le **microcèbe** est le primate le plus éloigné phylogénétiquement de l'Homme (Figure 20), et n'est pas permissif à la vMCJ. Toutefois, il est permissif aux souches d'ESB par voies intracérébrale et orale (Mestre-Francés *et al.*, 2012). Il a également été mis en évidence que le buffy coat d'un microcèbe symptomatique et infecté par l'ESB est infectieux (Bons *et al.*, 2002). En parallèle, plusieurs lémuriens (ainsi que des macaques rhésus) élevés en captivité ont développé spontanément une EST dans différents zoos français (Bons *et al.*, 1996 ; Bons *et al.*, 1997). Le mode de contamination le plus probable reste l'ingestion de croquettes contaminées par l'agent de l'ESB (Bons *et al.*, 1999).

Le **singe écreuil** semble particulièrement permissif aux souches de prions. Il est permissif au Kuru et à la forme sporadique de la MCJ par voie orale (Gibbs *et al.*, 1980 ; Brown *et al.*, 1994). Ce modèle développe une EST suite à l'exposition par voie orale à l'agent de la tremblante (Gibbs *et al.*, 1980). Il a également été montré que le singe écreuil est sensible à l'agent du GSS par voies intracérébrale (Masters, Gajdusek, et Gibbs, 1981) et intraveineuse (Ritchie *et al.*, 2016) (Tableau 16) suggérant un risque de contamination secondaire chez l'Homme. De plus, l'exposition intracérébrale de l'agent responsable de la CWD conduit à une EST dans ce modèle, suggérant un risque zoonotique de cette souche (Marsh *et al.*, 2005 ; Race *et al.*, 2009 ; Race *et al.*, 2014).

Le **macaque cynomolgus** est le plus proche phylogénétiquement de l'Homme en comparaison des lémuriens et des singes écreuils. Tout comme l'Homme, le macaque appartient aux singes de l'Ancien Monde (Figure 20). Il a largement été utilisé dans le cadre de l'évaluation expérimentale du risque lié à l'ESB, par voies intra-cérébrale (transmission en trois ans) et orale (cinq ans), et a permis de confirmer le lien entre cette souche et celle de la vMCJ (Lasmèzas *et al.*, 1996). Contrairement au singe écreuil, le macaque cynomolgus est permissif par voie intraveineuse à l'ESB et la vMCJ en deux ans (homogénat cérébral) et avec une période d'incubation minimale de cinq ans par transfusion (Tableau 16) (Herzog *et al.*, 2004 ; Lescoutra-EtcheGARAY *et al.*, 2015). Ces données suggèrent que le macaque est plus sensible à l'exposition de souches humaines (Ritchie *et al.*, 2016). L'utilisation des macaques a également permis de mettre en évidence d'autres souches présentant potentiellement un risque pour l'Homme, telles que l'ESB de type L (Comoy *et al.*, 2008), la TME (Comoy *et al.*, 2013) ou la tremblante (Comoy *et al.*, 2015).

Tableau 16 : Transmission de différentes souches de prion en fonction des voies d'inoculations dans les modèles simiens.

Principales souches		Singe écreuil	Macaque cynomolgus
Humaines	vMCJ	Oui (IC)/ Non (IV)	Oui (IC + IV)
	sMCJ	Oui	Oui
	fMCJ	Oui (GSS)	ND
Animales	ESB	Oui	Oui
	Tremblante	Oui	Oui
	CWD	Oui	Non

IC : intra-cérébrale/ IV : intra-veineuse/ vMCJ : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob/ sMCJ : sporadique/ fMCJ : familiale/ ESB : encéphalopathie spongiforme bovine/ CWD : maladie du dépérissement chronique.

Les modèles expérimentaux (notamment murins et simiens) ont eu un rôle pivot dans la compréhension des maladies à prions. Le bioessai a notamment permis de révéler le caractère transmissible des Prions, d'étudier les phénomènes de barrière d'espèce et de souligner les similitudes de souches entre les agents de l'ESB et de la vMCJ. D'autres modèles expérimentaux existent comme le hamster sensible à la souche expérimentale 263K (Kimberlin et Walker, 1986) ou encore un modèle plus récent dans l'étude des maladies à prions : le campagnol qui s'avère être sensible à la vMCJ humaine (Nonno *et al.*, 2006).

Chapitre III : Les modèles cellulaires

Les périodes d'incubation observées dans les modèles animaux peuvent être longues, jusqu'à deux ans chez la souris et plus de dix ans chez le singe (Brown *et al.*, 1994 ; Comoy *et al.*, 2015) ce qui représente un coût non négligeable et une gestion qui s'avère compliquée. De plus, la mise en évidence de la DL50 nécessite l'utilisation d'un grand nombre d'animaux par condition expérimentale ce qui pose un problème éthique majeur.

Les modèles cellulaires représentent ainsi une alternative aux modèles animaux. Ils ont notamment été utilisés afin de tester de nouvelles cibles thérapeutiques (Caughey et Raymond, 1993 ; Tagliavini *et al.*, 2000 ; Korth *et al.*, 2001 ; Schröder et Müller, 2002).

Qu'est-ce qu'un modèle infectable ?

La génération d'un modèle cellulaire infectable nécessite : (i) d'obtenir une PrP^{res} *de novo* et (ii) d'être en mesure de la détecter c'est-à-dire de la distinguer de la charge initiale (résiduelle) de celle néoformée. Pour cela, il est possible de réaliser des dilutions limites afin d'éliminer la PrP^{res} initiale. Il est important de prendre en compte la balance entre conversion/ dégradation et entre division cellulaire (Ghaemmaghami *et al.*, 2007). De façon plus précise, certains modèles présentent une infection aiguë qui s'accompagne d'une élimination de la PrP anormale au cours de la division cellulaire (Vorberg, Raines, et Priola, 2004).

1- Modèles cellulaires en deux dimensions

Exemples de cellules utilisées

Les modèles cellulaires peuvent être classés en deux groupes (pour revue Vilette, 2008) :

- **Les cellules sensibles aux souches de prions adaptées aux rongeurs** (ex. : N2a, SN56, PC12) ;
- **Les cellules sensibles aux souches de prions naturelles** (ex. : Rov, MDB).

Les cellules les plus utilisées sont des lignées cellulaires de neuroblastomes murins tels que les N2a (Bosque et Prusiner, 2000 ; Nishida *et al.*, 2000) et les SN56 issues de neurones cholinergiques (Baron *et al.*, 2006). Par exemple, les cellules N2A ont été infectées de façon stable par la souche RML (Butler *et al.*, 1988) et les cellules issues de rat (PC12) par les souches ME7 et 139A (Rubenstein *et al.*, 1992).

Plus récemment, il a été démontré que des lignées cellulaires non neuronales sont également sensibles à l'infection prion *in vitro* telles que :

- Les microglies, notées MG20, issues de souris sur-exprimant la PrP^C murine (Iwamaru *et al.*, 2007) ;
- Les cellules stromales spléniques murines sensibles à des souches de vMCJ adaptées à la souris (Akimov *et al.*, 2008) ;

- Les cellules issues de la moelle osseuse (Cervenakova *et al.*, 2011) pour lesquelles les auteurs sous-entendent un risque iatrogène par l'intermédiaire des greffes de cellules souches hématopoïétiques ;
- Les cellules des fibres musculaires (Herbst *et al.*, 2013).

Les premières cellules sensibles à une souche de prion de façon naturelle, c'est-à-dire non préalablement adaptée à son hôte, sont les cellules épithéliales de lapin, RK13, sensibles à la tremblante notées Rov (Vilette *et al.*, 2001). Ces cellules ont été génétiquement modifiées et n'expriment plus leur PrP^C endogène mais sur-expriment la forme VRQ ovine (Hunter *et al.*, 1997).

Les cellules sensibles aux souches humaines

Toutefois toutes les souches ne sont pas répliquées en culture notamment les souches humaines non adaptées aux rongeurs. La multiplication d'une souche de CJD a été mise en évidence une fois par l'équipe de Ladogana (Ladogana *et al.*, 1995) mais n'a pas été maintenue. En 2014, le premier modèle cellulaire sensible à différentes souches de prion humaines non adaptées à la souris a été mis au point (Hannaoui *et al.*, 2014). Ce modèle de culture primaire de neurones de la couche granulaire du cervelet a été généré à partir de souris transgéniques sur-exprimant la PrP^C humaine. Une cinétique d'augmentation de PrP^{res} *de novo* a été mise en évidence avec différentes souches de prion humaines : formes iatrogène et sporadique ainsi que la vMCJ.

2- Modèles cellulaires en trois dimensions : les neurosphères

Plusieurs études ont émis l'hypothèse que les neurosphères, par leur structure en 3D et leur hétérogénéité cellulaire, pourraient être un modèle pertinent dans l'étude des maladies à prions (revue : Haigh, 2017) (Figure 21).

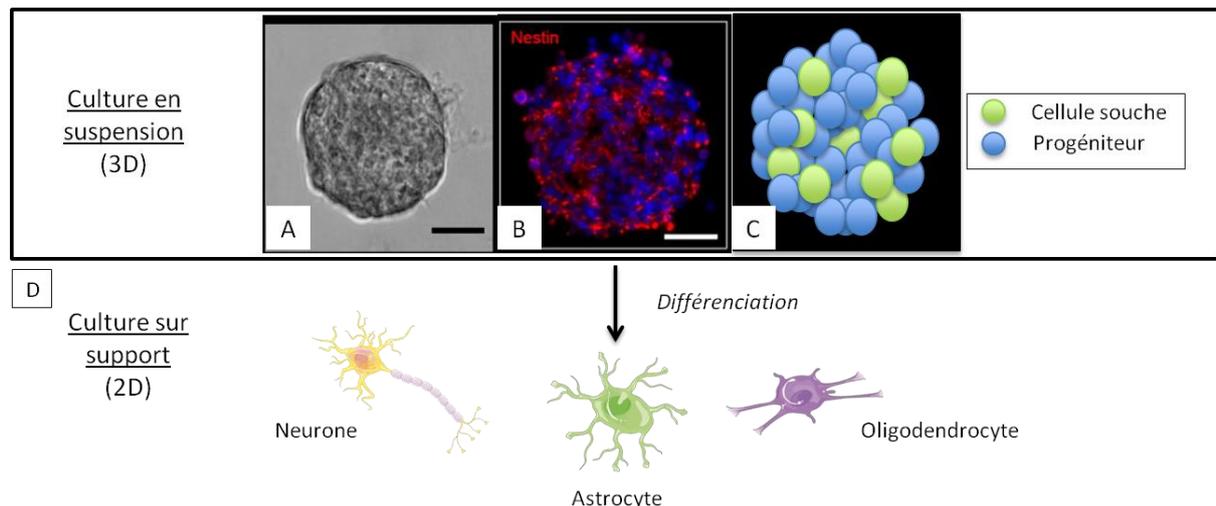


Figure 21 : Les neurosphères.

Les images A et B ont été extraites des travaux de Chaichana et son équipe (Chaichana *et al.*, 2009). Les barres d'échelle représentent 100 μ m. A) Neurosphère en suspension. B) Détection par immunofluorescence de la Nestine, protéine de filament intermédiaire exprimée au cours du développement embryonnaire et spécifique des cellules souches neuroépithéliales. C) Représentation schématisque de la composition des neurosphères. D) Capacité des neurosphères à se différencier en neurone, astrocyte et oligodendrocyte.

Initialement mises en évidence en 1992 à partir de cellules souches neurales isolées dans le striatum d'un rat adulte, les neurosphères ont la capacité d'être cultivées en suspension (Reynolds et Weiss, 1992). Cette technique de culture en 3D permet d'améliorer l'efficacité de la différenciation des cellules (Zhou *et al.*, 2016). Au cours de leur différenciation cellulaire, les neurosphères conduisent à la formation de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Figure 21D). En comparaison des cellules cultivées en mono-couche, les neurosphères permettent d'avoir des interactions cellule-cellule présentes dans le SNC humains.

En 2006, il a été montré que l'expression de la PrP^C dans les neurosphères augmente proportionnellement à leur différenciation (Milhabet *et al.*, 2006). Ces travaux confirment ceux d'autres équipes qui soulignent que le renouvellement, la prolifération des cellules souches neurales ainsi que leur différenciation en neurones seraient dépendants de l'expression de la PrP^C (Steele *et al.* 2006b). La même année, une amplification de PrP^{res} a été décrite dans des neurosphères précoces exposées à des souches de tremblante expérimentales (RML et 22L) (Giri *et al.*, 2006). Toutefois ces données ne seront pas retrouvées dans des cultures non différenciées (Milhabet *et al.*, 2006b ; Herva *et al.*, 2010). En parallèle, il a été montré que les neurosphères permettaient d'étudier les effets cytopathiques : réplication anormale de PrP préférentiellement dans les astrocytes par rapport aux autres types cellulaires (Iwamaru *et al.*, 2013).

Récemment, une détection de PrP^{res} néoformée a été mise en évidence dans des neurosphères exposées à des souches expérimentales de tremblantes adaptées (ME7 et 22L) (Relaño-Ginés, Lehmann, et Crozet, 2014). Dans cette étude, les neurosphères ont été isolées à partir de cellules souches neurales issues des deux zones de neurogenèse connues (zone sous-granulaire du gyrus dente et sous-ventriculaire) (Relaño-Ginés, Lehmann, et Crozet, 2014). Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que ces lieux de neurogenèse adulte sont impliqués dans la réplication centrale de l'infectiosité conduisant à une perte de fonction des cellules souches neurales et une limitation de la réparation tissulaire. Cette théorie avait déjà été formulée en 2006 (Milhabet *et al.*, 2006b). Les travaux de Relano-Gines et ses collaborateurs iront dans ce sens en démontrant pour la première fois une augmentation de la durée de survie des souris infectées grâce à la transplantation intracérébrale de cellules souches neuronales fœtales (Relaño-Ginés, Lehmann, et Crozet, 2014). Ainsi, la perte neuronale décrite dans les maladies à prions pourrait être causée par des dysfonctionnements de la machinerie cellulaire limitant la neurogenèse physiologique (Mouillet-Richard et Vilotte, 2015).

Les modèles cellulaires offrent une alternative importante à l'expérimentation animale. Toutefois, la majorité d'entre eux sont des lignées murines non sensibles aux souches de prions humaines (neurosphères compris).

Chapitre IV : Un potentiel modèle alternatif, les organoïdes neuro-ectodermiques

Face à l'utilisation d'animaux de laboratoire qui s'avère présenter des limites éthiques et aux modèles cellulaires peu sensibles aux souches humaines de prions, un des candidats prometteurs pour être les organoïdes neuro-ectodermiques. Ces structures appelées « mini-brains » (MBs) sont cultivées en 3D et miment la complexité du SNC humain. Le protocole, développé par Lancaster et ses collaborateurs, repose sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites humaines (cellules iPS, de l'anglais *induced pluripotent stem cells*) (Lancaster et al., 2013).

Cette dernière partie a pour objectif d'introduire ce nouveau modèle d'étude *in vitro* des maladies à prions. Les nombreux avantages qu'offrent les cellules iPS (dont sont dérivées les MBs) en termes de régénération tissulaire et de thérapies cellulaires ne seront pas abordés (Chien, 2008).

1- Quelques définitions clés

Deux propriétés majeures caractérisent les cellules souches (CS), et les distinguent des autres types cellulaires, à savoir :

- Une **capacité d'auto-renouvellement** : division théoriquement illimitée, c'est-à-dire que la cellule générée (dite « fille ») sera identique à la cellule d'origine (« mère »).
- Un **potentiel de différenciation** vers l'un des trois feuilletts embryonnaires formés au cours de la gastrulation : ectoderme, mésoderme, endoderme (Tableau 17).

Tableau 17 : Dérivation des trois feuilletts embryonnaires.

Feuilletts embryonnaires	Localisation	Dérive en :
Ectoderme	Externe	Epiderme et système nerveux
Mésoderme	Intermédiaire	Ensemble des organes à l'exception du système nerveux et digestif
Endoderme	Interne	Epithélium du tube digestif et des voies respiratoires ainsi que des glandes digestives

Les CS peuvent être classées en trois catégories en fonction de leurs degrés de différenciation ou potence (Figure 22) :

- **Les cellules souches totipotentes** : ces cellules ont la capacité de produire tous les lignages embryonnaires ainsi que des tissus extra-embryonnaires (cordon ombilical et placenta). Issues des premiers stades de division ce sont les seules à pouvoir reformer un organisme entier.
- **Les cellules souches pluripotentes** : elles se différencient en tous les types cellulaires à l'exception du tissu extra-embryonnaire.

Exemples : les cellules souches embryonnaires isolées à partir de la masse interne du blastocyste (Figure 22), les cellules iPS suite à une reprogrammation artificielle.

- **Les cellules souches multipotentes** : ces cellules se différencient en un seul lignage spécifique. Ainsi, elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation et leur devenir est déterminé. On peut citer l'exemple des cellules souches adultes hématopoïétiques.

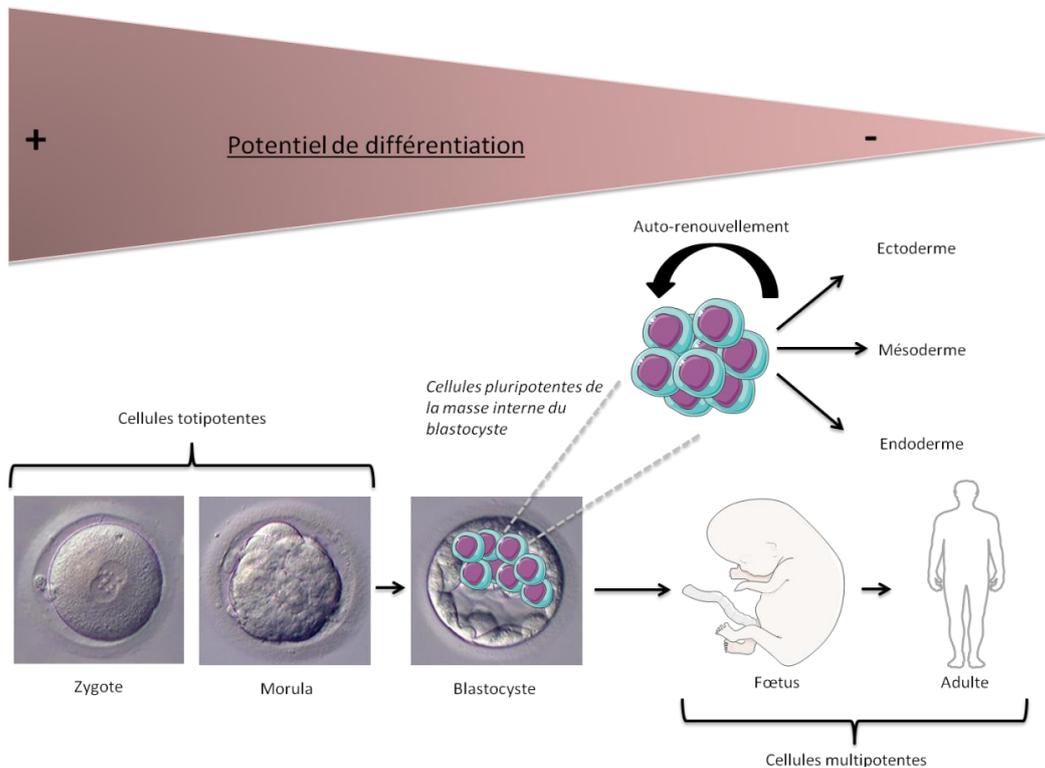


Figure 22 : Potentiels de différenciation des cellules souches au cours de la vie.

Images de zygote et du stade morula extraites de www.embryology.ch.

Les CS sont par définition des cellules indifférenciées à un moment donné : cet état est dit transitoire. Cette notion implique que le potentiel de différenciation des CS varie au cours de la vie d'un individu. Il est ainsi possible de distinguer les CS en fonction de leur origine : embryonnaire, foétale ou adulte (Figure 22).

En condition physiologique, les CS ont été mises en évidence dans la majorité des organes de mammifères adultes (sang, foie, cerveau, ...). Elles sont localisées dans des « niches » c'est-à-dire des micro-environnements particulièrement riches en facteurs permettant de les maintenir dans un état indifférencié (Li et Xie, 2005).

Dès 1998, une neurogenèse a été identifiée chez l'Homme adulte (Eriksson et al., 1998). Grâce à l'utilisation du BrdU, les auteurs rapportent qu'environ 20% des cellules marquées du gyrus denté expriment également des marqueurs neuronaux. Depuis, différentes études ont confirmé ces données (Reif et al., 2006 ; Manganas et al., 2007 ; Spalding et al., 2013). Les neurones nouvellement générés sont fonctionnels et participent notamment aux mécanismes de réparation et aux processus de plasticité cérébrale (Taupin, 2006b). Il est actuellement admis que deux régions fournissent de nouveaux neurones chez l'adulte (Figure 23) :

- **Zone sous-granulaire du gyrus denté** de l'hippocampe
- **Zone sous-ventriculaire** située sur la paroi des ventricules latéraux

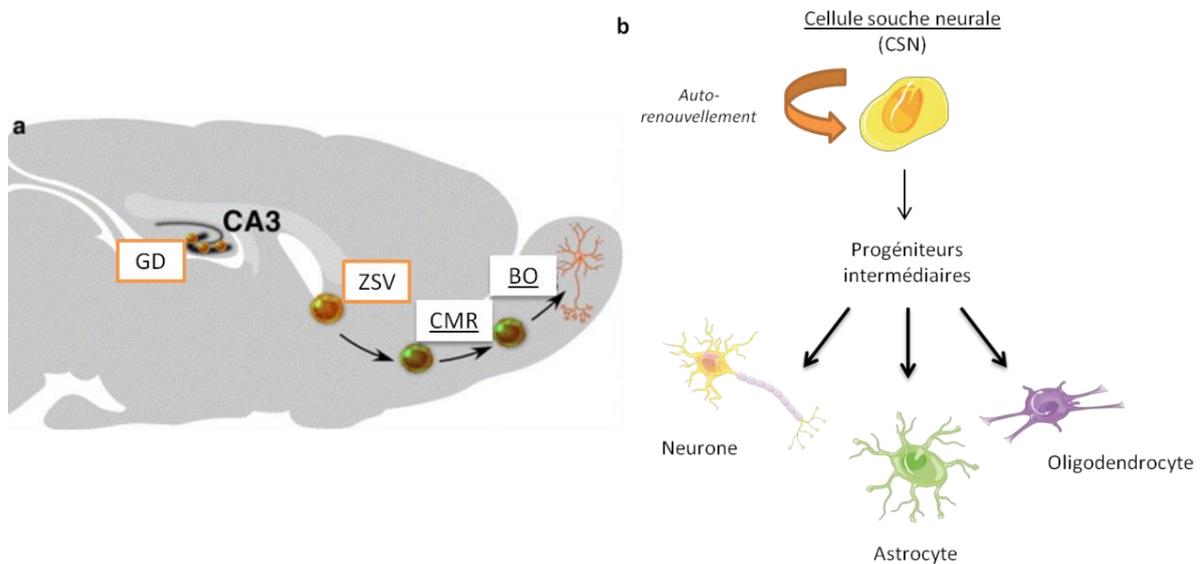


Figure 23 : Neurogenèse chez l'adulte (d'après Taupin, 2006).

A) Deux régions neurogéniques secondaires (orange) : le gyrus dente (GD) et la zone sous-ventriculaire (SVZ). Mise en évidence de la migration et différenciation dans le courant de migration rostral (CMR) vers le bulbe olfactif (BO). B) Les cellules souches neurales (CSN) sont capables de générer les trois types cellulaires majeurs du système nerveux : neurone, astrocyte et oligodendrocyte.

2- Les cellules souches pluripotentes induites

En 2006, les Professeurs Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi mettent au point un protocole de reprogrammation de cellules différenciées murines en cellules souches grâce à l'expression ectopique de quatre gènes (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*) codant pour des facteurs de transcription sélectionnés parmi 24 gènes candidats, connus pour être impliqués dans la pluripotence des cellules embryonnaires (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ces cellules indifférenciées ainsi générées, qualifiées de cellules iPS, possèdent les mêmes propriétés moléculaires et fonctionnelles que celles décrites dans les cellules souches embryonnaires (Rodolfa et Eggan, 2006) à savoir une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en n'importe quel feuillet primaire.

L'année suivante, la même équipe appliquera ce protocole à des fibroblastes humains pour dériver les premières cellules souches pluripotentes induites humaines (Takahashi et al., 2007). Les cellules iPS humaines obtenues sont également très similaires aux cellules souches embryonnaires humaines en termes de morphologie, prolifération, marqueurs de surface, expression génique et du statut épigénétique des gènes spécifiques des cellules pluripotentes. Ces cellules peuvent également se différencier *in vitro* en différents types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007).

En 2012, les travaux des Docteurs Gurdon²¹ et Yamanaka ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie et médecine pour leur découverte sur la capacité de reprogrammation de cellules matures (différenciées) en cellules pluripotentes.

²¹ Le biologiste britannique John Gurdon met en évidence que l'ADN de chaque cellule différenciée possède les informations nécessaires pour conduire au développement d'un organisme complet et fiable, en transférant le noyau d'une cellule somatique issue de l'intestin dans un ovocyte de xénope énucléé (Gurdon, 1962).

2.1 La reprogrammation cellulaire

La reprogrammation cellulaire est un processus qui permet de convertir artificiellement des cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes indifférenciées. Ce processus consiste en un remodelage épigénétique visant à restaurer les mécanismes de régulation transcriptionnelle activés dans les cellules souches embryonnaires. En pratique, la reprogrammation dure au minimum deux semaines et présente une faible efficacité d'environ 0,1% (Takahashi et Yamanaka, 2006). Elle est complexe à mettre en place, et repose sur le choix : (i) des **cellules différenciées à reprogrammer**, (ii) des **facteurs de transcription** et (iii) de la **méthode de reprogrammation** (Figure 24).

(i) **Choix des cellules différenciées à reprogrammer**

Théoriquement toutes les cellules de l'organisme peuvent être reprogrammées, toutefois certains critères sont à prendre en compte dans le cadre de protocole de recherche.

L'un des premiers éléments importants dans le choix des cellules de départ est l'accessibilité de ces dernières : utilisation de prélèvements issus de banque de tissus, post-chirurgicaux ou directement à partir de biopsie de peau (technique peu invasive) (Yamanaka, 2009).

L'autre condition reste la nécessité que les cellules soient expérimentalement « techniquables » d'une part en termes d'amplification et de maintien en culture.

Un autre élément crucial est la susceptibilité des cellules choisies à se reprogrammer. Par exemple, les kératinocytes humains (cellules de la couche superficielle de la peau et des phanères) offrent l'avantage d'être plus accessibles pour la reprogrammation que les fibroblastes (Aasen *et al.*, 2008). De plus, l'efficacité de la reprogrammation dépend du niveau de maturation des cellules et de leurs états (Loh *et al.*, 2009 ; Lo Sardo *et al.*, 2017). Il a ainsi été mis en évidence que des cellules iPS issues d'un donneur jeune présentent moins d'anomalies génétiques que celles générées à partir d'un individu plus âgé (Lo Sardo *et al.*, 2017).

(ii) **Choix des facteurs de transcription**

Yamanaka et son équipe ont réussi à générer des cellules iPS grâce à l'expression ectopique de quatre facteurs de transcription, appelé OSKM ou « cocktail Yamanaka » (Takahashi et Yamanaka, 2006) :

- **Oct3/4** : *Octamer-binding transcription factor 3/4*
- **Sox2** : *Sex determining region Y-box 2*
- **Klf4** : *Kruppel-like factor 4*
- **c-Myc** : *Cellular-myelocytomatosis*

Les protéines Oct3/4 et Sox2 sont exprimés dans les cellules souches embryonnaires (Nichols *et al.*, 1998 ; Avilion *et al.*, 2003), tandis que les protéines Klf4 et c-Myc sont fréquemment décrits dans les cancers humains. Klf4 est notamment impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules (Li *et al.*, 2005). Le facteur c-Myc joue également un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire (Cartwright *et al.*, 2005). Au cours de la reprogrammation cellulaire, c-Myc agit comme un « booster » du processus, tandis que Sox 2 et Oct 3/4 contribuent au maintien de la pluripotence, par l'intermédiaire de Nanog. Ce dernier facteur de transcription, Nanog, joue un rôle central dans l'identité des cellules pluripotentes dans des stades précoces du développement embryonnaire en contribuant à l'auto-renouvellement des cellules pluripotentes (Chambers *et al.*, 2003 ; Mitsui *et al.*, 2003). Le facteur Klf4 active également Nanog tout en inhibant l'apoptose induite par c-Myc.

Ainsi, c'est un parfait équilibre entre les différents facteurs de transcription qui est à l'origine de la génération des cellules iPS.

De nombreux protocoles ont été proposés afin d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation. En 2009, des cellules iPS ont été générées à partir de cellules souches neurales murines grâce à la seule expression d'Oct4 dans la mesure où ces cellules expriment de façon endogène les autres facteurs de transcription (Kim *et al.*, 2009). Cette étude souligne que (i) le facteur Oct4 est crucial dans le processus de reprogrammation en permettant le maintien de la pluripotence (Nadagawa *et al.*, 2008), et que (ii) les autres facteurs de transcription du cocktail de Yamanaka peuvent être remplacés. Ainsi, Thomson et son équipe ont réussi à générer des cellules iPS en remplaçant les deux oncogènes (Klf4 et c-Myc) par Nanog et Lin28 (Yu *et al.*, 2007). D'autres auteurs proposent une amélioration du protocole en combinant les six facteurs de transcription (Liao *et al.*, 2008).

En conclusion, différentes combinaisons des facteurs de transcription peuvent être envisagées dans le protocole de reprogrammation.

(iii) Choix de la méthode de reprogrammation

Initialement, la technique de reprogrammation développée en 2006 par Yamanaka et son équipe reposait sur la transduction d'un vecteur rétroviral (Takahashi et Yamanaka, 2006) : depuis différentes méthodes ont été développées (Figure 24).

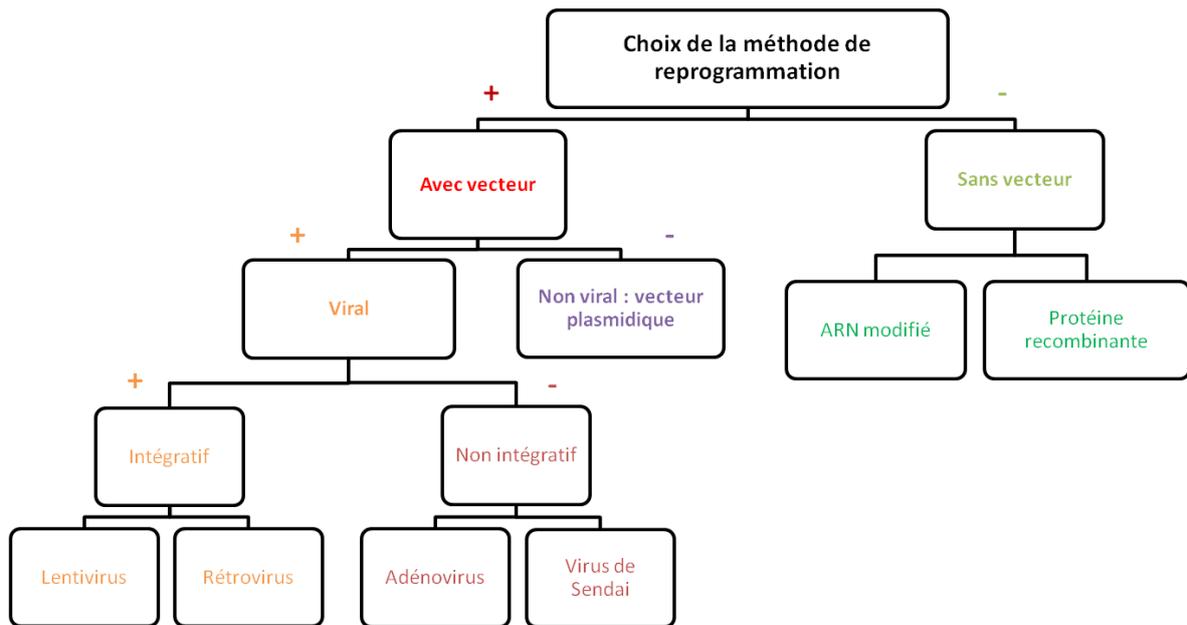


Figure 24 : Principales méthodes de reprogrammation des cellules matures en cellules souches pluripotentes induites.

Les vecteurs intégratifs lentiviraux (Yu *et al.*, 2007 ; Soldner *et al.*, 2009) ou rétroviraux (Takahashi et Yamanaka, 2006) permettent d'obtenir une reprogrammation efficace de l'ordre de 0,1%. Contrairement aux rétrovirus, les lentivirus peuvent se répliquer dans des cellules qui ne se divisent pas. Toutefois, l'intégration permanente de ces vecteurs viraux conduit à un risque de mutagénèse insertionnelle, et de réactivation de transgène (notamment c-Myc) conduisant à la formation de tumeur comme cela a été mis en évidence chez la souris (Okita, Ichisaka, et Yamanaka 2007 ; Nakagawa *et al.*, 2008).

Pour pallier à cela, des protocoles expérimentaux reposant sur l'utilisation de **virus non intégratifs** ont été mis en place. En 2008, l'équipe de Stadtfeldt a réussi à générer des cellules iPS murines grâce à l'utilisation d'adénovirus exprimant les quatre facteurs de Yamanaka (Stadtfeldt *et al.*, 2008). Leurs travaux soulignent qu'une reprogrammation efficace ne repose pas forcément sur l'intégration de virus dans le génome et qu'une expression transitoire des facteurs OSKM est suffisante. Cependant l'efficacité de la reprogrammation via les adénovirus est faible (comprise entre 0,0001 et 0,001% chez la souris). Grâce au virus de Sendai, Fusaki et ses collaborateurs ont généré des cellules iPS avec une efficacité aussi importante que celle décrite avec les vecteurs intégratifs (Fusaki *et al.*, 2009). Ce virus à ARN réplique son génome uniquement dans le cytoplasme des cellules transfectées et son expression diminue au cours des divisions cellulaires.

Enfin, d'autres **stratégies non virales** ont été proposées telles que des transfections d'ARN modifiés associées à une efficacité de reprogrammation de l'ordre de 1% (Warren *et al.*, 2010), l'utilisation de protéines recombinantes (Zou *et al.*, 2009), ou l'introduction de plasmides épisomaux (Okita *et al.*, 2008). Ces techniques non intégratives peuvent tout de même induire des mutations et un séquençage de l'ensemble du génome reste l'un des moyens de vérifier l'absence de mutation (Yamanaka, 2009).

En parallèle, différentes études ont été menées afin d'améliorer le protocole original tel que l'ajout de composés chimiques : acide valproïque (Huangfu *et al.*, 2008) ou ascorbique (Esteban *et al.*, 2010) ou via de nouvelles techniques de culture en 3D (Caiazza *et al.*, 2016).

Les limites de la reprogrammation

En fonction du processus choisi, une série d'inconvénients a été identifiée : des contraintes techniques (transfections répétées, durée), en termes de sécurité (mutagenèse insertionnelle) ou encore une faible efficacité de reprogrammation. Par ailleurs, plusieurs études récentes comparant les cellules IPS aux cellules souches embryonnaires mettent en évidence des anomalies au niveau des marqueurs épigénétiques notamment en termes de méthylation de l'ADN (Kim *et al.*, 2010 ; Nishino *et al.*, 2010) ou encore des différences caryotypiques (Bai *et al.*, 2015). Ce phénomène est appelé mémoire épigénétique, c'est-à-dire qu'il y a un maintien de l'empreinte de la cellule de départ et que la reprogrammation sera partielle voire aberrante (Figure 25) (Yamanaka, 2009). Décrit dans le cadre des cellules iPS d'origine murines (Kim *et al.*, 2010) et humaines (Nishino *et al.*, 2011), ce phénomène limite leur potentiel de différenciation *in vitro* (Tobin et Kim, 2012) et les cellules se différencieront préférentiellement dans leur lignage d'origine (Polo *et al.*, 2010). Néanmoins, ces marques épigénétiques semblent disparaître au cours des différents passages cellulaires (Kim *et al.*, 2010 ; Polo *et al.*, 2010).

Actuellement, les mécanismes ne sont pas compris et semblent intrinsèques au tissu d'origine. Toutefois, certaines études soulignent l'implication des méthodes de culture dans la différenciation des cellules iPS en fonction des méthodes de repiquage manuel ou des dissociations enzymatiques. Ainsi, il est important de sélectionner les cellules reprogrammées en réalisant des caractérisations des clones générés afin de vérifier l'absence d'anomalie chromosomique (caryotypage) et génétique (séquençage).

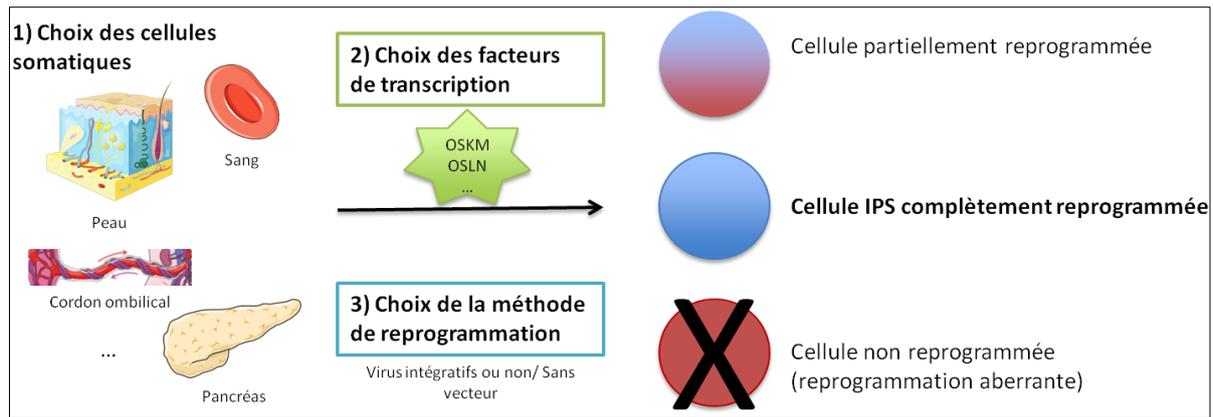


Figure 25 : Méthodologie de génération des cellules souches pluripotentes induites (d'après Yamanaka, 2009).

Le processus de reprogrammation peut conduire à des cellules complètement reprogrammées, partiellement ou de façon aberrante.

2.2 La caractérisation des cellules iPS

Plusieurs techniques *in vitro* (Figure 26) et *in vivo* (Figure 27) permettent de vérifier la pluripotence des cellules iPS.

Caractérisation *in vitro*

Le plus important dans la culture de cellules iPS est de mimer au plus près le micro-environnement des cellules souches en assurant leur maintien dans un état indifférencié grâce à des conditions de culture particulières. En parallèle, les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées afin d'obtenir une culture standardisée et exempt de toute contamination.

Classiquement, les cellules iPS sont cultivées sur un support nourricier (*feeder*) tel que les fibroblastes embryonnaires de souris (*mouse embryonic fibroblastes*, MEF). Il existe également des méthodes de culture sans support (dit *feeder-free*) reposant sur l'utilisation de matrice artificielle telle que le Matrigel®, hydrogel extrait de sarcome murin composé notamment de laminine, de collagène IV et de protéoglycanes (Kleinman, McGarvey, et Martin 1982).

De plus, les milieux de culture sont supplémentés en molécules limitant la différenciation et favorisant l'auto-renouvellement telles que :

- Le facteur inhibiteur de leucémie (*leukemia inhibitory factor*, LIF) pour les cellules d'origine murine (Smith *et al.*, 1988) ;
- Le facteur de croissance des fibroblastes basique (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) pour l'équivalent humain (Thomson *et al.*, 1998).

Le premier critère afin de vérifier la pluripotence des cellules iPS est l'**analyse morphologique des colonies**. Elles ont morphologiquement le même aspect que les cellules souches embryonnaires : de forme arrondie, les colonies doivent avoir des bords lisses et clairement délimités c'est-à-dire sans cellule différenciée en périphérie (Figure 26A). Les cellules sont très compactées au sein d'une colonie et également caractérisées par un ratio élevé noyau/ cytoplasme.

De plus, les cellules iPS expriment différents **marqueurs phénotypiques** liés à leur état de pluripotence qu'il est possible de détecter par immunomarquages (histologiques ou fluorescents), cytométrie de flux ou PCR comme présentés dans la Figure 25B :

- Les facteurs de transcription embryonnaires : Oct4, Sox2, ...
- Les protéines de la matrice extracellulaire : Tra-1-60 et Tra-1-81 (pour les cellules d'origine humaines) :
- Les glycoprotéines membranaires : SSEA-4 (cellules humaines) ou SSEA-1 (cellules murines).

En parallèle, l'**activité de la phosphatase alcaline**, enzyme exprimée dans les stades précoces du développement embryonnaire, peut être déterminée par simple coloration des colonies iPS.

Une autre technique permettant de vérifier la pluripotence des cellules iPS est la **formation de corps embryoides** (*Embryoid bodies*, EBs ; Figure 26C). Lorsque les cellules iPS sont cultivées en suspension et en absence de facteur limitant la différenciation (LIF/ bFGF), elles sont capables de s'agréger en 3D sous forme d'EB (*Itskovitz-Eldor et al., 2000*). Une fois cultivés sur un support adhérent, les EB se différencieront en tous les types cellulaires (Figure 26D-F).

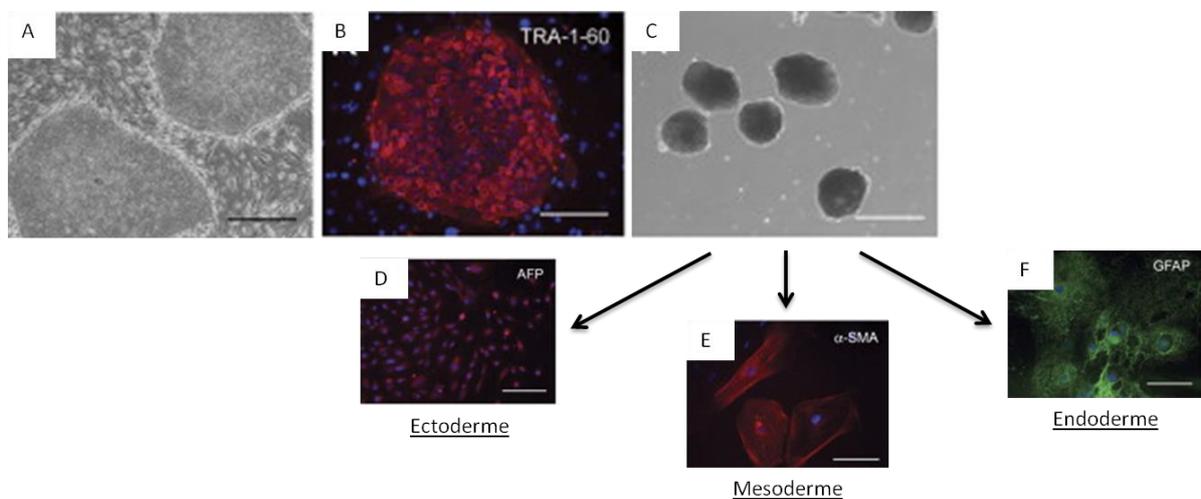


Figure 26 : Caractérisation *in vitro* de la pluripotence des cellules iPS.

Les images sont extraites de la publication de Takahashi *et al., 2007*. A) Aspect morphologique des cellules iPS : cellules denses, bords des colonies lisses. B) Immunomarquage d'une colonie iPS humaine avec TRA-1-60 (rouge), protéine de la matrice extracellulaire, et noyaux marqués au Hoechst (bleu). C) Corps embryoides en suspension. D-E-F) Différenciation des corps embryoides. D) Ectoderme : anticorps anti-alpha foeto-protéine (protéine produite au stade fœtal). E) Mésoderme : anticorps anti-muscle lisse (SMA). F) Endoderme : anticorps anti-GFAP (protéine glio-fibrillaire acide). Les barres d'échelles correspondent à 200 μ m pour (A) et (C) et 100 μ m pour (B) et (C-F).

Comme décrit précédemment, les marqueurs épigénétiques peuvent être déterminés par immunoprécipitation de la chromatine (Chip) ou séquençage. Enfin, les éventuelles anomalies chromosomiques peuvent être observées grâce à un caryotypage.

Caractérisation *in vivo*

De façon similaire à la formation des EBs *in vitro*, la **formation de tératomes** permet de valider la pluripotence des cellules iPS. Les tératomes sont des tumeurs bénignes composées de différents types cellulaires différenciées et pouvant produire des tissus dérivés des trois feuillettes embryonnaires. Concrètement, cela consiste à injecter les cellules souches (généralement par voie sous-cutanée) dans un modèle murin immunodéficient, tolérant aux xénogreffes (*Gutierrez-Aranda et al., 2010*). Environ un mois et demi après, la tumeur pourra être prélevée pour analyses histologiques (Figure 27). La formation de tératome reste à ce jour la technique de prédilection pour évaluer la pluripotence des cellules iPS.

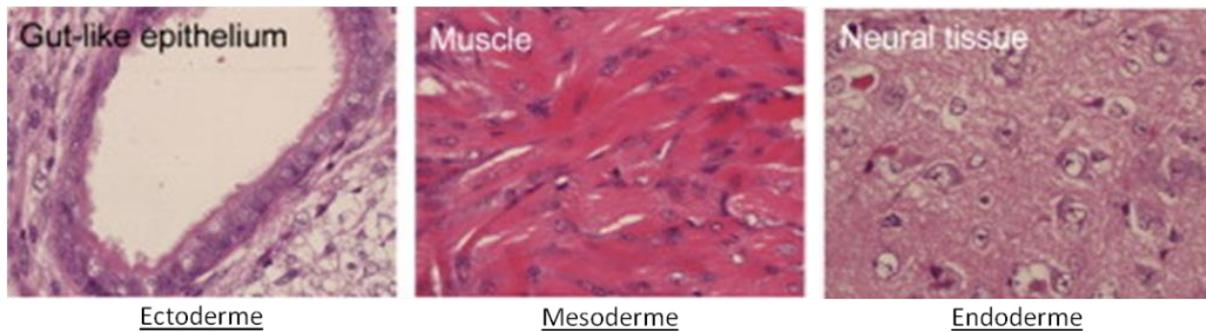


Figure 27 : Dérivation en trois feuillets embryonnaires d'un tératome (Takahashi *et al.*, 2007).

En plus de cette caractérisation fonctionnelle, il est possible de réaliser des souris chimériques en injectant les cellules iPS (uniquement d'origine murine) directement au sein du blastocyste d'une souris gestante. La production d'un organisme complet et viable soulignera la capacité des cellules iPS générées à se différencier dans les trois feuillets embryonnaires (Zhao *et al.*, 2009).

Ainsi, la reprogrammation de cellules différenciées met en avant la plasticité cellulaire. Les cellules iPS constituent une alternative aux cellules souches embryonnaires et offrent de nouvelles perspectives pour la recherche thérapeutique et la modélisation de pathologies notamment neurodégénératives où l'accès aux cellules nerveuses reste difficile.

3- Modélisation *in vitro* des maladies neurodégénératives

3.1 Modèles en deux dimensions : les cellules souches pluripotentes induites

De nombreux protocoles de différenciation des cellules iPS en neurones ont été mis au point notamment pour modéliser les maladies neurodégénératives (Park *et al.*, 2008) telles que la maladie d'Alzheimer (Yang *et al.*, 2016), de Parkinson (Csobonyeiova *et al.*, 2017) ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Hedges, Mehler, et Nishimura, 2016).

Deux exemples de maladies neurodégénératives familiales modélisées à l'aide de cellules iPS humaines

A l'instar des ESTs, des formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont été mises en évidence (Goate *et al.*, 1991). Elles sont également caractérisées par une accumulation extracellulaire d'A β et une dégénérescence neurofibrillaire intracellulaire enrichie en protéine tau hyperphosphorylée. En 2012, les deux marqueurs de la pathologie ont été retrouvés dans des cellules iPS issues de patients (Israel *et al.*, 2012). Récemment, Muratore et ses collaborateurs ont réussi à restaurer le phénotype d'augmentation de tau grâce à l'ajout *in vitro* d'anticorps anti-A β (Muratore *et al.*, 2014). Ces travaux vont dans le sens de l'hypothèse de la cascade amyloïde en sous-entendant que l'accumulation anormale de tau serait la conséquence de la modification d'A β (Muratore *et al.*, 2014).

La maladie de Parkinson est caractérisée par une accumulation anormale d'agrégats protéiques majoritairement composés d' α -synucléine et la destruction des neurones dopaminergiques. Les formes familiales sont rares et représentent environ 15% des cas totaux. Grâce aux progrès techniques de différenciation des cellules iPS, il est actuellement possible de générer des neurones dopaminergiques (Soldner *et al.*, 2009).

Ces neurones ainsi différenciés présentent une accumulation d' α -synucléine (Byers *et al.*, 2011) et des défauts mitochondriaux (Nguyen *et al.*, 2011), comme décrits chez l'Homme. Différentes approches thérapeutiques ont été testées sur les neurones dérivés de cellules iPS issues de patients parkinsoniens (revue : Cooper *et al.*, 2012).

Ainsi, les cellules iPS offrent la possibilité de modéliser les maladies neurodégénératives afin de tester de nouveaux médicaments candidats et d'appréhender les mécanismes physiopathologiques.

Maladie à prions

À ce jour, une seule équipe a généré des cellules iPS provenant de patient atteint d'une forme familiale de maladie à prion (Matamoros-Angles *et al.*, 2017). La patiente âgée de 54 ans est la sœur du premier cas décédé de GSS avec une mutation Y218N sur le gène *Prnp* (substitution au codon 218 d'une tyrosine par une asparagine) (Alzualde *et al.*, 2010). L'analyse neuropathologique avait révélé d'importants dépôts de PrP anormaux et des neurodégénérescences neurofibrillaires enrichies en protéine tau hyperphosphorylée (Alzualde *et al.*, 2010). Dans l'étude de Matamoros-Angles et ses collaborateurs, la reprogrammation des fibroblastes (biopsie cutanée) a été réalisée grâce à un rétrovirus exprimant les facteurs OSKM (Takahashi et Yamanaka, 2006). Les marqueurs de pluripotence ont été retrouvés dans ces cellules, appelées Y218N iPS. Les auteurs ont ensuite différencié les Y218N iPS en cellules nerveuses et mis en évidence différents marqueurs caractéristiques de la forme GSS humaine (non retrouvés dans les cellules iPS contrôles) tels qu'une astroglie réactionnelle, la présence de la protéine tau hyperphosphorylée et une mort cellulaire. Toutefois, aucune accumulation anormale de PrP n'a été retrouvée ni de génération de PrP^{res} anormale néoformée suite à l'exposition expérimentale de souches de prion murine et humaine. Cette étude suggère que les cellules Y218N iPS pourraient être un modèle d'étude pertinent des tauopathies et que des cellules iPS devraient être générées à partir d'autres formes de maladies à prions.

3.2 Modèles en trois dimensions : les organoïdes neuro-ectodermiques

Les organoïdes cérébraux, issus de la différenciation des cellules iPS, sont également capables de s'organiser en 3D. Contrairement aux neurosphères, ils miment au plus près la complexité du SNC grâce à une compartimentalisation répertoriant les différentes régions cérébrales et une hétérogénéité cellulaire.

En 2011, le premier système de culture en 3D basé sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines a été mis au point afin de générer des structures présentant les caractéristiques morphologiques de la rétine (Eiraku et Sasai, 2011). Deux ans plus tard, grâce à l'utilisation du Matrigel® (support artificiel de la matrice extracellulaire, Corning®) Lancaster et son équipe ont obtenu des organoïdes neuroectodermiques, qualifiés de « mini-brain » (MB) à partir de cellules iPS humaines (Lancaster *et al.*, 2013) (Figure 28). Ce protocole utilise uniquement des milieux de culture propices à la différenciation neurale (Lancaster *et al.*, 2013 ; Lancaster et Knoblich 2014). En effet, aucune molécule chimique inhibant les voies de signalisations ne sont introduits pour induire cette différenciation.

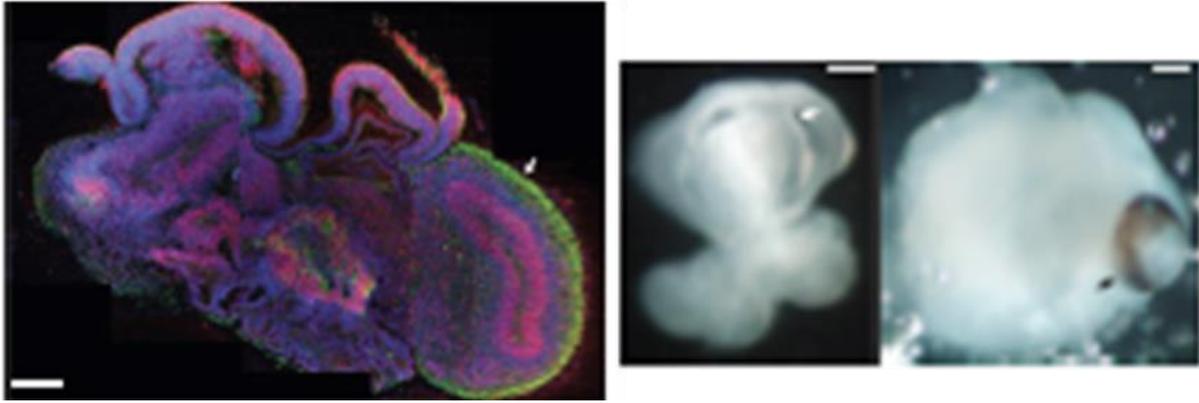


Figure 28 : Mini-brain : organoïde cérébral, en trois dimensions, issu de cellules souches pluripotentes induites humaines (Lancaster *et al.*, 2013).

Les barres d'échelle représentent 200 μ m.

En parallèle, des organoïdes spécifiques d'une région cérébrale donnée ont été générés (facteur-dépendant) mimant par exemple le cortex (Paşca *et al.*, 2015) ou l'hypothalamus (Merkle *et al.*, 2015). Contrairement aux MBs, ces organoïdes spécifiques d'une région cérébrale ne retracent pas l'ensemble du processus de neurodéveloppement mais offrent l'avantage d'être plus reproductibles d'une structure produite à l'autre. Depuis différentes optimisations du protocole ont été mise en place (Jo *et al.*, 2016).

Initialement Lancaster et son équipe ont utilisé les MBs afin de modéliser la microcéphalie (Lancaster *et al.*, 2013). Depuis les organoïdes cérébraux ont été utilisés dans la modélisation de différentes pathologies à partir de cellules iPS provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Choi *et al.*, 2014 ; Raja *et al.*, 2016) ou d'autisme (Mariani *et al.*, 2015). Enfin, plusieurs équipes ont utilisé les organoïdes cérébraux afin d'appréhender les mécanismes physiopathologiques mis en place suite à une infection par le virus Zika (Garcez *et al.*, 2016).

Quatrième partie :
Problématique et objectifs du projet de thèse

Les ESTs humaines et animales se distinguent des autres maladies neurodégénératives par la présence d'une protéine infectieuse et transmissible. En 1996, l'apparition des premiers cas de vMCJ chez l'Homme suite à l'ingestion de produits bovins contaminés fait craindre une dissémination inter-espèce rapide et massive de l'agent responsable (Will *et al.*, 1996). Grâce à la mise en place de plusieurs mesures de prévention, les incidences des nombres de cas d'ESB et de vMCJ associés, ont diminué de façon significative. Actuellement, ce mode de contamination primaire est d'ailleurs considéré comme maîtrisé. Toutefois, la description de trois cas de vMCJ secondaires à des actes transfusionnels au RU relance les inquiétudes (Llewelyn *et al.*, 2004 ; Wroe *et al.*, 2006 ; HPA, 2007). Ce risque est accentué par d'une part l'absence de test systématique de détection de l'infectiosité au moment du don de sang, et d'autre part par une prévalence de porteurs asymptomatiques plus importante que prévue d'environ 1/2000 (Gill *et al.*, 2013). Ces individus pourraient ainsi constituer un réservoir potentiel pour les contaminations secondaires inter-humaines.

Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire avaient évalué expérimentalement le risque transfusionnel chez le macaque cynomolgus, l'un des modèles les plus pertinents en termes de physiopathologie humaine. Ces travaux ont permis de : (i) confirmer la sensibilité du macaque à l'infection prion suite à des actes transfusionnels et de (ii) mettre en évidence l'apparition de syndromes, jamais décrits jusqu'alors appelés myélopathies (Lescoutra *et al.*, 2015 ; Comoy *et al.*, 2017). Ce syndrome myélopathique est caractérisé par des atteintes médullaires ainsi qu'une absence de détection de PrP anormale avec les techniques classiquement utilisées. Il a aussi été mis en évidence que ce phénotype atypique était transmissible à des souris conventionnelles (Comoy *et al.*, 2017).

Au regard de cette forme d'expression inattendue de maladies à prion, les travaux de ma thèse portent sur l'étude expérimentale de la physiopathologie des différents phénotypes observés chez les macaques transfusés (souches dites « classiques » et myélopathiques), à travers l'étude des mécanismes de réplication périphériques (étude A) et centraux (étude B).

Étude A : Évaluation descriptive de la réplication périphérique

L'un des objectifs de mon projet doctoral a été d'étudier les mécanismes périphériques conduisant à l'établissement soit d'une vMCJ soit d'un phénotype myélopathique. Dans un premier temps, nous avons procédé à un état des lieux de la réplication périphérique chez les macaques transfusés en analysant en immunohistochimie les organes lymphoïdes (rates et ganglions lymphatiques).

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si les organes lymphoïdes, et tout particulièrement la rate, supportaient la réplication périphérique des prions associés au phénotype myélopathique comme cela est décrit dans les maladies à prions « classiques ». Nous avons ainsi exposé par voie intraveineuse des souris immunodéficientes à différentes souches myélopathiques. Une partie de ces résultats sont présentés sous forme d'article (Rontard *et al.*, 2017, en préparation).

Afin de déterminer si ces formes atypiques sont spécifiques aux macaques ou pertinentes chez l'Homme, ces travaux ont été complétés par une étude descriptive de rates issues de différentes espèces (humains, primates non-humains, ruminants et rongeurs). Une partie de ce projet a été financé par l'ANR « *UnmaskingBloodPrion* » dont l'objectif général est de détecter des prions cryptiques dans le sang (2016 – 2018).

Étude B : Mise en place d'un modèle cellulaire d'infection par différentes souches de prions

Afin de pouvoir étudier les mécanismes centraux impliqués dans ces phénotypes atypiques, nous avons souhaité disposer d'un modèle alternatif à l'expérimentation animale présentant de longues périodes d'incubation. Notre stratégie a consisté à utiliser un modèle récemment décrit d'organoïde neuroectodermique, appelé « Mini-brain » (MB), dérivé à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (Lancaster *et al.*, 2013). Ce projet, pour partie financé par la fondation des patients CJD (2015) et l'ANR « *UnmaskingBloodPrion project* » (2016 – 2018), va conduire à la soumission d'un second article (Rontard, Levavasseur, *et al.*, 2017 ; en préparation).

À mon arrivée au laboratoire en 2014, la génération des MBs n'était encore qu'aux prémices de son développement puisque décrite depuis moins d'un an (Lancaster *et al.*, 2013 ; Lancaster et Knoblich, 2014). Par ailleurs, cette technologie a été mise en place très récemment au laboratoire par Serena Pavoni (doctorante au CEA-SEPIA de 2013-2017). L'objectif de son projet de thèse était de développer un modèle d'étude d'interactions de la PrP^C et de l'A β (Pavoni *et al.*, 2017, en préparation).

Dans un premier temps, la mise en place de ce modèle a nécessité la maîtrise technique de cette méthode de culture en trois dimensions, et la caractérisation des structures organoïdes ainsi générées. Dans un second temps, deux stratégies d'exposition à des souches de prion ont été testées sur des MBs issus de cellules humaines. Une fois la preuve de concept que les MBs pouvaient être utilisés en tant que modèle d'infection, nous avons décliné le protocole de génération des organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes simiennes et murines.

Cinquième partie : Résultats

Chapitre I : Rappels des résultats précédemment obtenus

Nos travaux ont eu pour but principal d'évaluer expérimentalement le risque prion en termes de santé publique lié aux actes transfusionnels et aux porteurs asymptomatiques. Ils se basent sur le modèle développé au laboratoire depuis de nombreuses années d'infection expérimentale du macaque cynomolgus (Figure 29). Comme décrit précédemment, ce modèle reste l'un des plus pertinent dans l'étude des maladies à prions humaines en termes de symptomatologie, physiopathologie, susceptibilité aux souches humaines, espérance de vie et proximité des séquences de la PrP^C. Dans le cadre de l'évaluation du risque transfusionnel, ce modèle offre également l'avantage d'utiliser des volumes sanguins, proportionnellement au poids, équivalents à ceux décrits en médecine humaine.

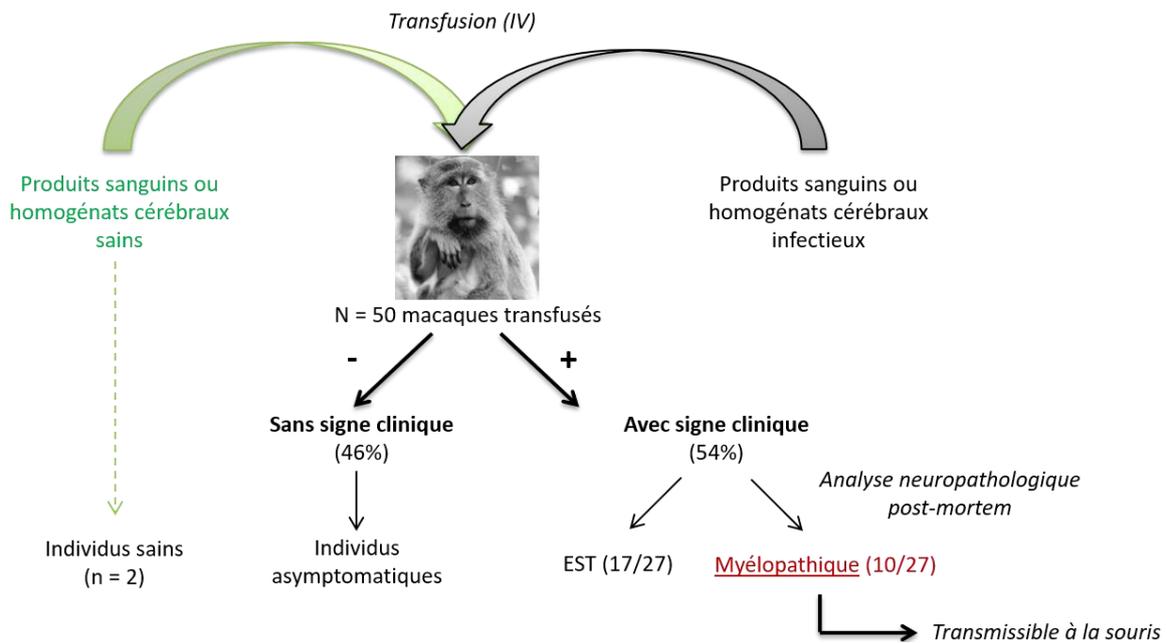


Figure 29: Mode opératoire d'inoculation d'agents infectieux par voie intraveineuse des macaques cynomolgus.

Au total, 52 macaques cynomolgus ont été exposés par voies intraveineuse (IV) à différents produits sanguins (sangs issus de primates contrôles, de macaques exposés aux souches d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), et prélevés en phase clinique ou asymptotique). À titre de contrôle, deux macaques ont été transfusés avec des homogénats sains. Sur les 27 macaques présentant des signes cliniques neurologiques, 17 ont développé le tableau attendu d'une encéphalopathie spongiforme transmissible (EST). Les 10 autres ont présenté un syndrome myélopathique transmissible à différents modèles murins.

Ces résultats obtenus précédemment à mon arrivée au laboratoire portent sur l'étude de 50 macaques transfusés avec des produits sanguins ou cérébraux dérivés d'individus exposés aux agents de l'ESB ou de la vMCJ (Figure 29). Au total, 46% des macaques exposés sont à ce jour asymptomatiques et parmi eux peuvent figurer des porteurs asymptomatiques comme cela a déjà été décrit chez l'Homme. Sur les 27 macaques présentant des signes cliniques, 63% ont développé une maladie à prion similaire associée aux marqueurs décrits chez l'Homme (spongiose, gliose et accumulation de PrP^{res} dans les organes périphériques et le SNC). Les 10 autres macaques transfusés ont développé un syndrome myélopathique (Lescoutra-Etchegaray *et al.*, 2015 ; Comoy *et al.*, 2017).

Les analyses histologiques soulignent que le syndrome myélopathique (n = 10 macaques transfusés) est caractérisé par une atteinte médullaire sans implication notable des structures cérébrales (Tableau 18). Une démyélinisation associée à une perte des neurofilaments est observée dans les cordons postérieurs de la moelle épinière et dans la zone maculaire des nerfs optiques, et ce de façon cohérente avec respectivement les pertes de sensibilité et de vision fine décrites lors des examens cliniques de ces animaux. En parallèle, des lésions de pseudo-nécrose sont présentes dans les cornes antérieures de la moelle épinière, centrées sur les cervicales bases mais pouvant être plus étendues (de la 4^{ème} cervicale à la 5^{ème} dorsale), ainsi qu'au niveau du noyau spinal du nerf trijumeau dans le tronc cérébral.

Les analyses biochimiques ne révèlent pas de PrP^{res} chez les macaques développant un syndrome myélopathique. Un traitement enzymatique à la PNGase F a été réalisé afin de mettre en évidence les formes déglycosylées de la PrP^C. Ces travaux révèlent une faible expression voire une absence de PrP^C pleine longueur et du fragment C2 chez les macaques myélopathiques par rapport aux individus sains (Travaux de thèse de Nina Jaffre, 2010-2014).

Tableau 18 : Principales caractéristiques lésionnelles des macaques cynomolgus transfusés.

	EST (17/27)	Myélopathique (10/27)
Symptomatologie	Hyperactivité/ Agressivité	Troubles de la vision fine Atteinte des membres supérieurs : ataxie, perte de sensibilité et des gestes fins
PrP (rate, cv, me)	+	Absence de PrP détectable ¹
Atteinte (cv)	+	- (Tractus optique/ tronc cérébral)
Atteinte (me)	+	+
Nature des lésions	Spongiose, gliose, perte neuronale	Démyélinisation de la substance blanche, lésion substance grise (statut <i>spongiosus</i> à pseudo-nécrose)

¹Prétraitement enzymatique par la protéinase K suivi d'une immunodétection en WB, ELISA et IHC/ utilisation de méthodes acellulaires (PMCA, QuIC).
Cv : cerveau/ EST : encéphalopathie spongiforme transmissible/ me : moelle épinière

Récemment, la transmissibilité du syndrome myélopathique à des souris conventionnelles (modèle Swiss) a été mise en évidence suite à des inoculations par voies intracérébrales et intraveineuses d'homogénats cérébraux ou de sang total (Comoy *et al.*, 2017). Ces souris présentent des atteintes des membres postérieurs. L'analyse *post-mortem* révèle une spongiose dans le cerveau et/ ou la moelle épinière, avec ou sans PrP^{res} (Figure 30). Ainsi, seule une partie des caractéristiques des maladies à prions est retrouvée. Ces atteintes, observées chez les souris exposées, ont été qualifiées de phénotypes incomplets et seront dénommés atypiques dans la suite du manuscrit.

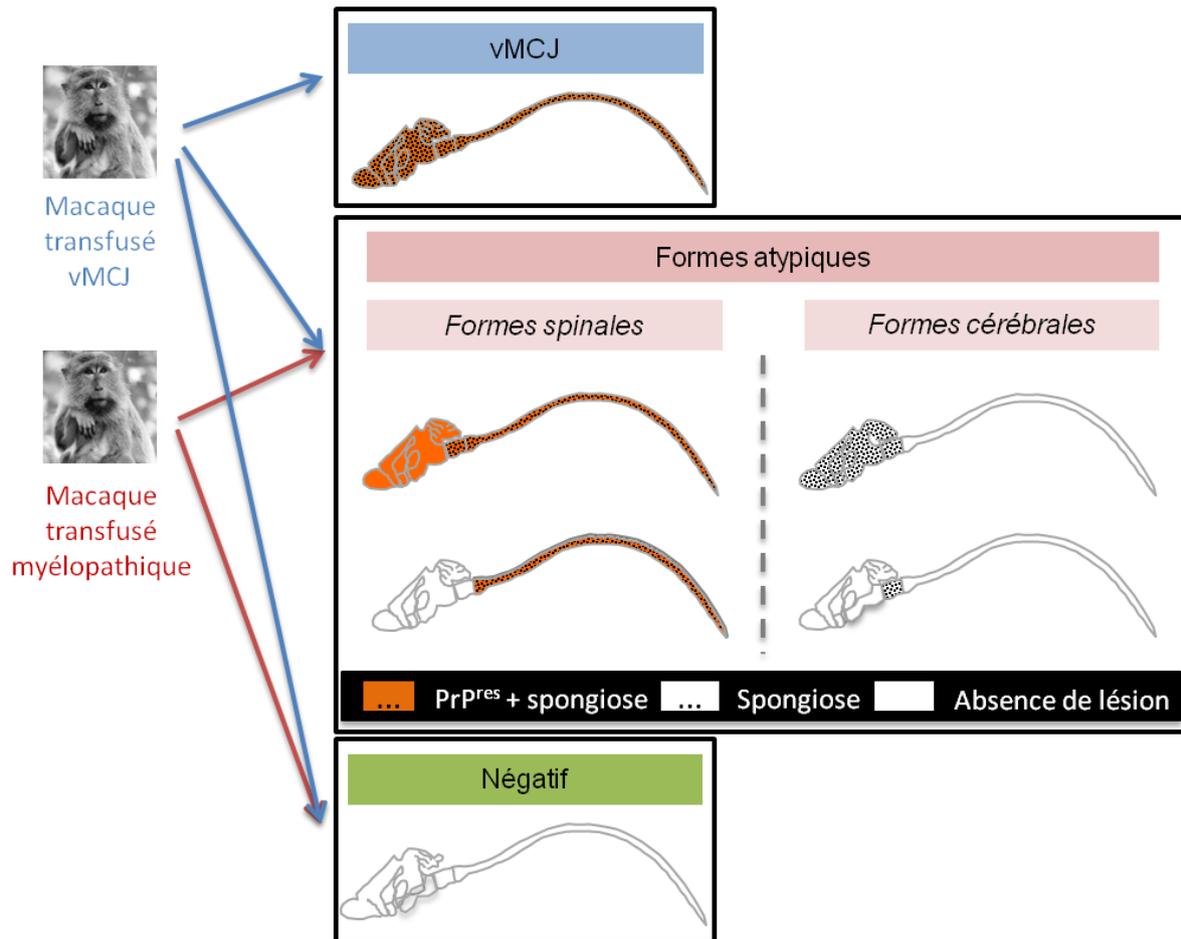


Figure 30 : Phénotypes observés chez les souris conventionnelles suite aux inoculations par voies intraveineuse et intracérébrale de souches classiques et atypiques (d'après Comoy *et al.*, 2017).

Les macaques transfusés présentant des signes cliniques ont développé soit une variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ, bleu) soit un syndrome myélopathique (rouge). Chez les souris conventionnelles, Swiss, trois phénotypes sont observés : une vMCJ (répertoriant l'ensemble des caractéristiques des maladies à prions), des syndromes atypiques centrés sur la moelle épinière (forme spinale) ou sur le cerveau (forme cérébrale).

Ainsi, le syndrome myélopathique décrit chez les macaques transfusés et les phénotypes incomplets observés chez les souris exposées ne répondent pas aux critères de diagnostic actuels des maladies à prions (spongiose et accumulation de PrP pathologique dans le cerveau). Si de telles formes atypiques existent chez l'Homme, elles ne seraient donc pas diagnostiquées comme maladies à prion mais comme une autre entité pathologique. De plus, le caractère transmissible de ces formes amène tout un questionnement sur un éventuel risque en termes de santé publique.

Chapitre II : Évaluation descriptive de la réplication périphérique (étude A)

1- Apparition de phénotypes atypiques suite à des expositions périphériques

Résumé des résultats en cours de soumission (Rontard et al., 2017 ; en préparation) dont une partie a été présentée sous forme de présentation affichée au congrès Prion (Édimbourg, mai 2017).

L'objectif général de cet article est d'évaluer expérimentalement le risque lié aux porteurs asymptomatiques dans le cadre des actes transfusionnels grâce au macaque cynomolgus. Dans un premier temps, la présence de PrP anormale a été recherchée dans le sang et les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) des différents macaques transfusés au sein du laboratoire (vMCJ et myélopathiques). Dans un second temps, l'infectiosité des produits sanguins issus des macaques transfusés a été évaluée expérimentalement dans deux modèles murins : un premier conventionnel (modèle Swiss) et un second immunodéficient (NSG).

Caractérisation des organes périphériques chez les macaques transfusés

L'analyse en IHC de l'ensemble des ganglions lymphatiques disponibles pour chacun des macaques inclus dans cette étude (n = 17 vMCJ et n= 10 myélopathiques) a été faite. Une forte hétérogénéité d'accumulation de PrP anormale dans les ganglions lymphatiques est observée chez les macaques transfusés. Concrètement, sur les 27 macaques seuls 55% présentent une réplication périphérique détectable dans les ganglions lymphatiques (86% de réplication quand on se restreint seulement aux macaques transfusés développant une vMCJ).

La mise en évidence de phénomènes d'agrégation de la PrP dans le sang a été menée en parallèle, à l'aide de la méthode acellulaire d'amplification de PMCA en collaborations avec le docteur Olivier Andréoletti (INRA, Toulouse) et ses collègues. La PMCA offre l'avantage d'être sensible à l'agent de la vMCJ de macaque contrairement à la QuiC. L'analyse de la rate des macaques transfusés développant une vMCJ souligne que ceux présentant une forte positivité dans les organes lymphatiques ont également une forte accumulation de PrP^{res} dans la rate. Ces données semblent indiquer l'existence d'une corrélation forte entre l'accumulation de PrP anormale dans les organes périphériques et l'infectiosité dans le sang.

Concernant les 10 macaques transfusés développant un syndrome myélopathique, trois d'entre eux présentent des dépôts anormaux de PrP dans les organes périphériques. De plus, la majorité des macaques myélopathiques n'ont pas de PrP^{res} détectable dans la rate (ELISA et WB) ni de phénomènes d'agrégation dans le sang (PMCA).

Ainsi, l'analyse des différents macaques transfusés souligne le lien entre la présence de PrP anormale dans les organes périphériques et la forte infectiosité dans le sang. Le risque transfusionnel de la vMCJ se limiterait ainsi aux donneurs ayant la plus forte réplication périphérique, qui sont attendus minoritaires dans la population générale. Ce risque est réduit par une série de mesures mises en place afin de garantir la sécurisation des actes transfusionnels (exclusion des donneurs,

leucoréduction, procédés de fabrications, ...). Toutefois, les différentes transmissions réalisées dans les modèles murins conduisent à l'apparition de phénotypes atypiques quels que soient les niveaux de réplication périphérique des donneurs, suggérant ici un risque transfusionnel correspondant plus important.

Enfin, une grande hétérogénéité d'accumulation de PrP anormale est retrouvée dans les ganglions lymphatiques des macaques transfusés (vMCJ et myélopathiques). En effet, bien qu'un nombre conséquent de follicules ait été analysé (200 minimum/ animal), certains macaques vMCJ présentent peu voire aucun dépôt anormal de PrP dans les organes périphériques. Ces résultats suggèrent une faible valeur prédictive négative des études réalisées sur les organes lymphoïdes. Par conséquent la prévalence des porteurs asymptomatiques, déterminée sur la base de pièces post-opératoires d'organes lymphoïdes, pourrait être sous-estimée.

Étude de l'infectiosité sanguine grâce à deux modèles murins

La seconde partie de ce travail réalisée grâce à des modèles murins a pour objectif la compréhension des mécanismes de réplication périphérique suite à une exposition périphérique ainsi que la caractérisation des souches myélopathiques. Notre stratégie expérimentale a été d'inoculer par voies IV et IC (à titre de contrôle) à un modèle murin immunodéficient (NSG), différents inocula provenant de macaques ayant développé une vMCJ ou un syndrome myélopathique. Ces données ont été mises en parallèle à celles déjà obtenues et publiées en utilisant des souris conventionnelles (Swiss) ([Comoy et al., 2017](#)).

L'exposition périphérique par voie intraveineuse à des souches de vMCJ conduit à l'apparition de vMCJ et de phénotype atypique chez les souris conventionnelles (Swiss) tandis que les souches myélopathiques conduisent uniquement à des phénotypes atypiques associés ou non à la présence de PrP^{res}. De plus, la présence de PrP anormale valide l'appartenance des syndromes myélopathiques au large spectre des maladies à prions. Contrairement au modèle murin conventionnel, les souris NSG exposées aux mêmes inocula par voie périphérique développent uniquement des phénotypes atypiques, tandis que la vMCJ est bien transmissible par voie intracérébrale. Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que les souches myélopathiques sont capables de transmettre une maladie à prions avec une réplication périphérique, si elle existe, indépendante d'un système immunitaire fonctionnel.

Heterogeneity of the transfusional risk linked to the variant Creutzfeldt-Jakob Disease: experimental evidences in murine and simian models

Running head: Heterogeneous vCJD prion peripheral replication

Jessica Rontard¹, Jacqueline Mikol¹, Olivier Andreoletti², Jérôme Delmotte¹, Jean-Philippe Deslys¹, Emmanuel Comoy¹

¹Commissariat à l'Énergie Atomique, DRF/Jacob/SEPIA, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

²UMR INRA-ENVT 1225, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France.

Address reprint requests to: Emmanuel Comoy, CEA, DRF, SEPIA, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France e-mail: emmanuel.comoy@cea.fr

Conflict of interest statement: The authors declare they have no conflict of interest.

ABSTRACT

The replication of prions in lymphoid organs before neuroinvasion constitutes the basis of prevalence studies and developing diagnostic strategies, that are set up to assess and manage the secondary transfusional risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). Consequently, the revelation of the existence of healthy carriers of vCJD infection, which could be more than 100-fold more numerous than the reported clinical patients, questions the real magnitude of this risk. Notably, we have recently shown in cynomolgus macaques and conventional mice that the transfusion of contaminated blood products efficiently transmits vCJD, but also unexpected incomplete disease phenotypes (corresponding to a myelopathic syndrome in macaques) that escape the current criteria of prion diseases. These experimental models of human prion diseases constitute a unique opportunity to evaluate the relationship between peripheral replication and blood infectivity. In the present study, we observed in intravenously-contaminated vCJD macaques a highly heterogeneous intra- and inter-individual distribution of apparent peripheral replication in lymphoid organs that appeared to be correlated to blood prion burden. These observations suggest that prevalence studies would minimize the real magnitude of vCJD healthy carriage, but the efficiency of vCJD transmission through transfusion would be limited to the donors with the highest peripheral levels of infectivity, confirming thus the pertinence of ante mortem blood screening to secure blood transfusion against vCJD. Conversely, peripheral replication in lymphoid organs of myelopathic primates was rarely detected with current techniques, and incomplete prion phenotypes could be transmitted to mice through transfusion in the absence of functional immune system. The masked prion strains associated to those atypical phenotypes would involve peripheral mechanisms different from vCJD, independent of the immune system: if such forms should exist in humans, they would escape those epidemiological and diagnostic tests.

Keywords: cynomolgus macaques - immunodeficient mice – peripheral replication – prion diseases – transfusional risk – immune system

ABBREVIATIONS: BSE = bovine spongiform encephalopathy; CNS = central nervous system; FDC = follicular dendritic cells; GALT = gut associated lymphoid tissue; HE = hematoxylin eosin; IC = intracerebral; IHC = immunohistochemical; IV = intravenous; LN = lymph nodes; NSG = non-obese diabetic SCID gamma; PrP= prion protein; RBC = red blood cell; TSE = transmissible spongiform encephalopathy; UK = United Kingdom; vCJD = variant Creutzfeldt-Jakob disease;

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are a group of incurable neurodegenerative disorders affecting humans (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) and animals. They are characterized by the accumulation of abnormal isoform of prion protein in the Central Nervous System (CNS) and pathological features including tissue (spongiform changes) and cellular (astrogliosis and neural loss) lesions. During the past decades, the large epizooty of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle has resulted in a massive exposure of European consumers through contaminated food [1]. Fortunately, the reported number of resulting variant-CJD (vCJD) cases [2] is to date limited to 228 cases worldwide, suggesting a high cattle-to-human species barrier [3]. However, a second risk for public health safety exists related to inter-human transmission through blood and blood-derived products: in the United Kingdom (UK), four cases of vCJD infection were reported to be linked to contamination through transfusion with Red Blood Cells (RBCs) [4–7] and a fifth case presumably through plasmatic derivatives [8]. Precautionary measures including ban of blood donation [9] and systematic de leukocytation [10] have been put in place to limit this mode of contamination, but plasma remains a potential infectious source of contamination.

After peripheral administration, prions first replicate in peripheral tissues before invading the nervous system [11]: during this long asymptomatic phase, the peripheral replication occurs within the follicles of secondary lymphoid organs including lymph nodes, spleen and gut associated lymphoid tissue (GALT) [12,13]. On this basis, immunohistochemical analyses of the presence of abnormal PrP deposition in archived appendectomy pieces were recently performed and identified 16 positive among 32441 tested appendices [14]: the prevalence of clinically-silent infected individuals in UK would be estimated 1/2000, around 200-fold more numerous than detected clinical patients. These unexpected healthy carriers should be considered as potent blood and tissues donors [15]. As a supplementary measure for improving transfusion safety towards prions, different promising ante mortem tests are currently under development [16–19]: most of them are able to detect blood infectivity prior to the onset of clinical signs, but none is to date validated for routinely screening blood donors.

The experimental model of cynomolgus macaque is reputed to be highly relevant to model human situation towards vCJD [20–24] and it is proposed to serve as blood collection to validate those diagnostic test candidates [25]. Notably, vCJD is transmissible in this model through transfusion of blood products derived from infected-donors [26,27], with volumes that are proportional to the volumes used in human transfusion according to the weight of recipients. In parallel, it is to note that several transfused macaques developed a different neurological pathological entity based on spinal cord and brainstem involvement that turned out to be a distinct phenotypic expression of the prion infection [27]. The occurrence of this myelopathic syndrome in macaques and incomplete prion phenotypes in transfused conventional mice question the amplitude of transfusional risk in human population.

The parameters and conditions driving the blood infectivity are not well defined: notably, the duration of the asymptomatic period during which a real transfusional risk exists is to date unknown. As a first set of evidences to determine the conditions for an efficient transfusional transmission of vCJD, we analyzed the presence of abnormal PrP in peripheral organs of several macaques peripherally exposed to vCJD and their ability to transmit disease through their blood.

MATERIALS AND METHODS

Ethic statements

Macaques and mice were housed and handled in accordance with the European Directive 2010/63 related to animal protection and welfare in research, and were under constant internal surveillance by veterinarians. Social enrichment was a constant priority with individual activities and feeding controlled according to the risk of infection. Animals were handled under anaesthesia to limit stress, and euthanasia was performed for ethical reasons when animals lost autonomy. CETEA ethical committee approved the present experiments (approvals 12-020, 12-067, 12-072 and 16-034). The sizes of experimental groups were defined in accordance with the “reduction” and “refinement” concepts of 3R’s, depending on the respective expected rates of transmission. According to the specificity of the macaque model, each case is to be considered as single clinical case.

Experimental animals

Captive-bred 2-5-year-old male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) were provided by Noveprim (Mauritius), checked for the absence of common primate pathogens before importation, and handled in accordance with national guidelines. They were all Met/Met homozygous at codon 129 of the prion protein gene (*PRNP*). Six weeks-old female Swiss ND4 and Non-obese diabetic (NOD) SCID gamma (NSG) (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) mice were provided by Janvier Labs (France). NSG mice are characterized by a severe immunodeficiency with an absence of T/ B cells, no functional NK cells [28]. Animals were housed in level-3 animal care facilities (agreement numbers A 92-032-02 for animal care facilities, 92-189 for animal experimentation) and regularly examined at least once a week. No statistical randomization method was used to allocate animals to experimental groups. Samples for biochemical and histological analyses were coded (two different codes) and respective investigators were blind during analyses.

Intravenous exposure of cynomolgus macaques

Cynomolgus macaques were exposed through the intravenous (IV) route to brain or blood products issued from vCJD-exposed donors. Details are provided in Table I. Clarified brain homogenates were obtained after successive cycles of sonication / centrifugation, according to a previously described protocol [26] selected as a representative of the different protocols proposed to model blood infectivity [29]. Blood samples were sampled in citrate buffer and fractionated, if any, as previously described [27]. After development of clinical signs, animals were euthanized by IV injection of pentobarbital. Brain, spinal cord, spleen, and several lymph nodes (mandibular, inguinal, axillary, mesenteric, popliteal, and tonsils) were collected for biochemical and immunohistochemical analyses.

Bioassay in murine models

Mice were inoculated through IV or intracerebral (IC) routes with brain homogenates (in a 5% glucose solution) or blood products derived from vCJD or myelopathic macaques. We used healthy

brain and blood as negative controls, and as positive control the brains derived from mice infected with the mouse-adapted BSE strain 6PB1 [30,31]. After anesthesia through the intraperitoneal route with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), mice were IC inoculated in the right parietal cortex (20 μ l of 1% brain homogenates). IV injections of 200 μ l of blood samples or brain homogenates (0,1% wt/vol) were performed on vigil animals. Mice were examined weekly during the preclinical period and daily during the clinical period. At the onset of clinical signs (motor impairment, weakening, wasting) or at the end of the study, the animals were euthanized by pentobarbital injection (180 mg/kg). The presence of pathological prion protein (biochemical and immunohistochemical approaches) and lesions was assessed in their brain and their spinal cord.

Biochemical PrP analysis.

PrP was purified according to the TeSeE purification protocol (Bio-Rad). Purified samples were detected by ELISA (TeSeE kit for primate samples [26], or a specific ELISA using Saf-53 as the capture antibody and 11C6 as the detection antibody for mouse samples [32]).

Histopathology and immunohistochemistry

CNS tissues were fixed in 4% formalin for histological examination. Spongiform changes were scored on hematoxylin-eosin (HE) stained slides and neuronal lesions on Luxol-fast blue stained slides. Peripheral tissues from macaques were fixed in Carnoy's fluid. Deposits of abnormal PrP were detected using the Discovery Automated IHC Stainer (Ventana). After epitope retrieval with guanidinium thiocyanate 4M for 16 minutes, PrP was evidenced using the monoclonal antibody 3F4. For each lymph node of each macaque, the number of positive and total lymphoid follicles were scored.

PMCA reactions

A transgenic mouse line that expresses ovine A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ PrP variant PrP^c (tgShXI) was used to prepare the PMCA substrate as previously described [33,34]. PMCA amplification was performed as previously described [17]. Each PMCA run included a reference vCJD sample (10% brain homogenate) as a control for the amplification efficiency. Unseeded controls (1 unseeded control for 8 seeded reactions) were also included in each run. PMCA reactions were seeded with 1/50 diluted tissues homogenates (10% weight/volume). For each sample, at least four replicates were tested in two independent runs. Control sample was serially diluted ten-fold (10^{-2} to 10^{-10}) before being used to seed PMCA reactions. Samples were submitted to five successive amplification rounds, each composed of 96 cycles (10s of sonication-14 minutes and 50 seconds of incubation at 39.5°C) in a Qsonica700. After each round, (i) reaction products (1 volume) were mixed with fresh substrate (9 volumes) to seed the following round while (ii) a part of the same product was analysed by Western Blot (WB) for the presence of PK resistant PrP as previously described [17]. Immunodetection was performed using two different monoclonal PrP-specific antibodies, Sha31 (1 μ g/ml) [35], and 12B2 (4 μ g/ml) [36], which recognize the amino acid sequences YEDRYRE (145-152), and WGQGG (89-93) respectively.

RESULTS

Intra- and inter-individual heterogeneity of abnormal PrP distribution in lymphoid organs

We included in this study 27 cynomolgus macaques exposed to vCJD-infected brain or blood products through the intravenous route: 17 developed clinical vCJD whereas 10 developed a

myelopathic syndrome (table I). For each animal, euthanasia was performed at the terminal stage of the disease and lymphoid organs were sampled during their autopsy. The presence of PrPres in their spleens was assessed through ELISA, providing a semi-quantitative estimation of their positivity, and the presence of abnormal PrP in several of their lymph nodes was analyzed through IHC (observation of 110 to 1713 follicles per animal respectively).

Among the 17 clinically-affected vCJD animals, the peripheral distribution of abnormal PrP was widely heterogeneous despite intravenous exposures susceptible to spread infectivity in the whole body (Fig. 1 and Fig.2), ranking from no (one animal, #5, Fig.1a) or few (Fig. 1b) apparent accumulation in spleen and lymph nodes, to the positivity of all the lymphoid organs tested (two animals, #10 and #20, Fig. 1c). This heterogeneity is notably observed between four replicate animals (macaques #10, #11, #12 and #13) that were identically inoculated the same day and that all exhibited clinical signs 29 to 33 months post inoculation. We did not evidence obvious correlation between the degree of positivity and the anatomical location of the studied lymph nodes.

As an illustration of this heterogeneity, vCJD macaques were ranked in Fig. 2 according to their apparent peripheral replication. To go further in details, seven spleens were strongly positive using a highly sensitive biochemical approach, seven other ones were weakly positive (including 3 very close to the background, macaques #6, #11 and #12) and the three last ones were found negative (macaques #5, #7 and #13). Taking all these animals together, 1,745 among the 10,065 analyzed follicles (17%) exhibited abnormal PrP deposition, bringing 199 lymph nodes to be considered as positive among 357 (56%). Among these positive lymph nodes, only 32 of them (16%) exhibited PrP accumulation in more than half of the observed follicles. Practically, between 2% and 24% of follicles present were positive in 99 positive lymph nodes (44%); between 25% and 60% in 83 samples (47%) and 61% to 100% in 17 samples (9%).

Among the 10 myelopathic macaques, no accumulation of abnormal PrP was detected in 7 animals, whereas two animals exhibited weak positivity in only one of their lymphoid organs each (spleen in macaque #16 and 7 positive among 336 follicles in the tonsil of macaque #8). The tenth macaque (#19, Fig. 1D) exhibited high levels of peripheral replication within spleen and two thirds (33/49) of its lymph nodes, a higher level than most of the vCJD macaques. It is to note that this animal was exposed to the same inoculum (red blood cells concentrates) as macaque #20, the vCJD macaque which exhibited the highest levels of peripheral replication.

Blood infectivity in vCJD-exposed primates

The infectivity of blood products derived from nine macaques (six vCJD and 3 myelopathic primates) sampled at the terminal stage of their disease was assessed through bioassay in Swiss mice after intravenous inoculation (Fig. 2). Partial transmission of vCJD was observed in recipient mice of the three vCJD macaques (#3, #9 and #10) with the highest levels of peripheral accumulation but not in recipient mice of the six other animals, suggesting a link between a high blood infectivity and levels of peripheral replication for the vCJD prion strain. Conversely, incomplete prion disease phenotypes were noticed in the nine groups of recipient mice whatever the initial levels of peripheral replication in the corresponding donor macaques.

In macaques, transfusion of blood derived from “high-replication” macaque #9 transmitted vCJD to one macaque in 68 months (Fig. 2), whereas two macaques that were recipients of blood from “low-replication” macaque #13 (spleen negative and only 68/999 positive follicles corresponding to 8/43

positive lymph nodes) are still asymptomatic 88 months post inoculation. Moreover, macaques #20 and #26 developed vCJD 58 and 69 months respectively after having been transfused with pools of blood samples from macaques #8, #9, #10 #11, #12 and #13, and macaque #22 developed vCJD 52 months after having been transfused with pools of blood samples from macaques #3, #4, #5, #6 and #7 (details have been already published[26]).

Detection of abnormal PrP in buffy coats of twelve of those macaques was assessed by PMCA. All were detected as positive, except the two vCJD macaques (#5 and #13) with the lower, if any, peripheral replication. It is to note that the three blood samples that transmitted vCJD were detected as highly positive from the third round of PMCA.

The role of immune system in peripheral replication

Since myelopathic macaques are globally lacking apparent peripheral replication of PrPres into lymphoid organs, we aimed to evaluate the role played by the immune system into the physiopathology of the non-vCJD associated phenotypes studied here. Immunocompetent Swiss and immunodeficient NSG mice were thus exposed to brain or blood samples derived from vCJD and myelopathic macaques through either the intracerebral or the intravenous routes, and the disease phenotypes were characterized on the basis of the presence of PrPres and spongiform changes in the CNS. Results in Swiss mice were previously published and extensively defined the different kinds of disease phenotypes [27].

After intracerebral inoculation, NSG and Swiss mice exhibited similar results. Firstly, NSG mice are susceptible to the mouse-adapted BSE strain 6PB1 after incubation periods (181 +/- 5 days) similar to those obtained in immunocompetent mice (figure 3) [30,31]. Secondly, all the NSG mice exposed to vCJD-infected macaque brain developed clinical signs (table II). Seven of them (88%) exhibited cerebral PrPres and spongiform changes limited to the brainstem and spinal cord 446 +/- 20 days post exposure, whereas the eight animal (546 days) exhibited vacuolation strictly limited to the brainstem but no apparent PrPres. According to the incomplete phenotypes we previously described in mice, these animals exhibited bulbospinal (7 mice) and bulbar (1 mouse) profiles respectively [27]. When Swiss mice were exposed to the same inoculum, all the recipient mice developed a vCJD profile with shorter incubation periods (305 +/- 19 days), associating accumulation of PrPres and spongiform changes in the whole CNS (figure 3c).

Thirdly, atypical phenotypes devoid of apparent PrPres accumulation were observed in around 40% of both NSG and Swiss mice intracerebrally inoculated with brain homogenate of myelopathic macaque #8. In NSG mice, atypical phenotypes were also observed in 4 (13%) mice exposed to brain samples issued from other myelopathic macaques.

After intravenous exposure, the two mouse strains provided different results. Transmission of vCJD occurred in Swiss mice intravenously exposed to vCJD-infected brain (100%) or blood (2%), but no recipient NSG mice exhibited PrPres. Conversely, the same proportions of atypical phenotypes devoid of apparent PrPres accumulation (4 to 8%) was observed in all the groups of recipient Swiss or NSG mice. These results suggest that a functional immune system is compulsory for the peripheral replication of vCJD strain, but not for prion strains linked to incomplete prion phenotypes and primate myelopathy.

DISCUSSION

In the present study, we analyzed the peripheral distribution of prions in vCJD experimentally infected cynomolgus macaques, as a key element for the risk assessment of inter-human transmission of vCJD: this experimental model is the outmost pertinent one to mimic the primary [22,24] and secondary [21,26,27] risks of vCJD for human public health, by combining a susceptibility to a similar spectrum of prion diseases, a similar physiology and proportional body parameters to humans. In the human situation, contaminations occurred mainly through the oral route, presuming a replication of prions targeting the lymphoid organs draining the digestive tract; here, we rather focused on primates exposed through the intravenous route for a theoretical wider spreading of peripheral replication, even if we previously demonstrated that in macaques the same distribution of PrPres occurred in lymphoid organs following oral or intravenous exposure [21].

We scored for each animal the numbers of positive lymph nodes, and inside them the numbers of positive follicles. In parallel, the amount of PrPres in spleen was estimated through ELISA approach and the seeding activity of abnormal PrP in blood through PMCA. At all these levels of analyses, we observed a wide heterogeneity of prion replication in the lymphoid organs of vCJD-infected cynomolgus macaques sampled at the terminal stage of the disease, without identifying an obvious correlation with the anatomical sites, the inocula or the incubation periods. At first sight, such a heterogeneous distribution may be considered as unexpected, but different observations in human vCJD already suggested such a situation. Indeed, at one extreme side of this panel, the total absence of apparent PrPres accumulation in a clinically vCJD-affected macaque (#5) is evocative of the previous reports by others about vCJD patients with extremely low, if any, detectable peripheral PrPres [37,38]. Moreover, in the last large scale survey on human appendixes, Gill et al. also reported an heterogeneity of the percentages of positive follicles in positive appendixes of asymptomatic individuals [14], with 7 (44%) positive appendixes exhibiting positivity in 25% to 60 % of their follicles, while 4 (25%) and 5 (31 %) had more than 60% or less than 25% positive follicles respectively. In our primates sampled at the terminal stage of vCJD, a comparable heterogeneity was observed, even if the proportion of highly positive samples (positivity in more than 60 % of the follicles) was lesser (9% in primates versus 25% in humans, a statistically non-significant difference because of the low numbers of positive human appendixes). This difference might be due to a preferential targeting of peripheral replication in appendixes of orally-exposed individuals.

As a supplementary aspect of the heterogeneous distribution of prion peripheral replication, 153 (44%) of analyzed lymph nodes were found negative in vCJD-infected primates at the terminal stage of the disease, including a total of 3377 follicles (mean of 22 ± 19 follicles per lymph nodes, ranging from 3 to 138 follicles per lymph node). It has been shown in sheep that peripheral replication is low at the early stages of incubation period and increases with time[39]: if these both observations in animal models are transposable to the human situation, the proportion of negative follicles would be increased in vCJD-infected individuals during the clinically silent incubation phase: thus the prevalence of healthy carriers recently reevaluated at 1/2.000 in UK [14] would be underestimated, in a proportion that remains to be defined. It must be reminded here that 10 millions of UK inhabitants are supposed to have been exposed to BSE [40], i.e. more than 100-fold more people than the presumed numbers of healthy carriers [14].

At the opposite this notion liable to improve the risk of secondary transmission by increasing the prevalence of healthy carriers, our results suggest that the risk of transfusional transmission of vCJD would be limited to the donations issued from the few donors with the highest levels of peripheral replication, and this is in coherence with the low numbers of reported vCJD transfusional cases to date. Indeed, our transmission experiments in conventional mice and macaques are limited to a few number of samples, but successful transmissions are restricted to the samples associated to the highest global levels of peripheral replication in lymphoid organs. According to PMCA, vCJD seeding activity in blood would be a good image of this global peripheral replication: the blood of the vCJD-infected macaque devoid of peripheral replication (#5) was found negative by PMCA and was unable to transmit vCJD, whereas blood samples from macaques #3, #9 and #10 were found highly positive and transmitted vCJD. These results constitute a supplementary evidence that the PMCA technique used here, that previously demonstrated a high sensitivity as finding as positive several blood samples sampled two years before the onset of clinical signs[17,34], would be a pertinent basis to secure transfusion by eliminating the most dangerous samples even if unable to identify all the infected donors.

For myelopathy, the situation is different. Indeed, the ability to transmit atypical prion phenotypes to mice through transfusion occurred whatever the apparent levels of peripheral replication of prion in primate donors as evidenced by the biochemical, immunohistochemical and amplification techniques we used in this study. Moreover, our results suggest that the onset of this unexpected prion disease is not supported by a peripheral replication that can be evidenced by the current techniques like those we used. Indeed, among the 10 myelopathic macaques included in this study, seven ones exhibited no apparent peripheral replication of abnormal PrP, and the three other ones were exposed to inocula that induced vCJD in replicates with consequent levels of peripheral replication (myelopathic macaque #8 received the same inoculum as vCJD macaque #9, myelopathic macaque #19 received the same inoculum as vCJD macaques #20 and #21, and myelopathic macaque #16 received deleukocyted RBCC corresponding to the whole blood transfused to macaque #22). The peripheral abnormal PrP evidenced in those three last primates might be the signature of the parallel replication of the vCJD strain.

We wondered whether the absence of apparent peripheral replication in lymphoid organs of myelopathic macaques is due to a real absence of peripheral replication in those organs or to our capacity to detect it. We used NSG mice that combined a non-functional immune system and the susceptibility to vCJD prions and to incomplete related phenotypes. In those mice, the rates of incidence of incomplete prion phenotypes after peripheral exposure are similar to those observed in Swiss mice, whereas vCJD was not transmitted as expected. Those results indicate that the atypical prion strains linked to the incomplete prion phenotypes and macaque myelopathy do not need to replicate on a functional immune system before neuroinvasion after peripheral exposure. Either a direct neuroinvasion may occur as it may partially occurred in different immunodeficient models [41–43], or a peripheral replication would occur elsewhere than at the level of the functional immune system. To date this point remains to be elucidated.

As a conclusion, this study revealed that peripheral replication of vCJD prions is widely heterogeneous and cannot be considered as an ultimate criterion for vCJD diagnosis, whereas blood-related masked prions rely on different peripheral mechanisms prior to neuroinvasion. At least three epidemiological consequences can be drawn here: (i) the prevalence of silent infected people might

be wider than expected when using conventional techniques; (ii) the transfusional vCJD risk would be limited to the highly infectious samples, that would be easily detected with current diagnostic techniques; (iii) masked prions are out of control with current techniques to date and would follow different pathophysiological mechanisms. New tools are needed to analyze and circumvent these newly described original prion strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Lasmezas and C. Jas-Duval for the initiation of the animal experiments, and N. Lescoutra, V. Durand, E. Correia, S. A. Culeux, Luccantoni-Freire, C. Durand, S. Jacquin, S. Cottin and J. Delmotte for precious technical assistance. We acknowledge European Commission (QLK1-CT-2002-01096), French Research Funding Agency (ANR), Health Canada and MacoPharma for funding parts of those experiments.

STATEMENT OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.R. analysed the lymphoid organs, contributed to the mouse experiments, analysed the histological data and wrote the manuscript. J.M. reviewed all the histological analyses and scoring. O.A. performed the PMCA analyses. J.D. performed the histological techniques. J.P.D. supervised the study, contributed to the experimental design and edited the manuscript. E.C. coordinated the study, designed the mouse experiments, contributed to the biochemical and histological studies, analysed the data and wrote the manuscript.

REFERENCES

- 1 Chen CC, Wang YH, Wu KY. Consumption of bovine spongiform encephalopathy (BSE) contaminated beef and the risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Risk Anal Off Publ Soc Risk Anal* 2013; **33**: 1958-1968
- 2 Will RG, Ironside JW, Zeidler M, *et al.* A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; **347**: 921-925
- 3 European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the 'Quantitative assessment of the human BSE risk posed by gelatine with respect to residual BSE': Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the "Quantitative assessment of the human BSE risk posed by gelatine with respect to. *EFSA J* 2006; **4**: 312
- 4 Llewelyn C, Hewitt P, Knight R, *et al.* Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *The Lancet* 2004; **363**: 417-421
- 5 Peden AH, Head MW, Diane LR, *et al.* Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *The Lancet* 2004; **364**: 527-529
- 6 Wroe SJ, Pal S, Siddique D, *et al.* Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet Lond Engl* 2006; **368**: 2061-2067
- 7 Brown P. Creutzfeldt-Jakob disease: reflections on the risk from blood product therapy. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 2007; **13 Suppl 5**: 33-40
- 8 Peden A, McCardle L, Head MW, *et al.* Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemoph Off J World Fed Hemoph* 2010; **16**: 296-304
- 9 Vamvakas EC. Universal white blood cell reduction in Europe: has transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease been prevented? *Transfus Med Rev* 2011; **25**: 133-144
- 10 Gregori L, McCombie N, Palmer D, *et al.* Effectiveness of leucoreduction for removal of

infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet* 2004; **364**: 529-531

11 Kimberlin RH, Walker CA. Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system. *J Gen Virol* 1988; **69 (Pt 12)**: 2953-2960

12 Mabbott NA, Farquhar CF, Brown KL, *et al.* Involvement of the immune system in TSE pathogenesis. *Immunol Today* 1998; **19**: 201-203

13 Head MW, Ritchie D, Smith N, *et al.* Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. *Am J Pathol* 2004; **164**: 143-153

14 Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, *et al.* Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* 2013; **347**: f5675

15 Brown P, Brandel JP, Sato T, *et al.* Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 7

16 Jackson GS, Burk-Rafel J, Edgeworth JA, *et al.* A highly specific blood test for vCJD. *Blood* 2014; **123**: 452-453

17 Lacroux C, Comoy E, Moudjou M, *et al.* Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004202

18 Concha-Marambio L, Pritzkow S, Moda F, *et al.* Detection of prions in blood from patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 370ra183

19 Bougard D, Brandel J-P, Bélonrade M, *et al.* Detection of prions in the plasma of presymptomatic and symptomatic patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med* 2016; **8**: 370ra182

20 Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, *et al.* BSE transmission to macaques. *Nature* 1996; **381**: 743-744

21 Herzog C, Sales N, Etchegaray N, *et al.* Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* 2004; **363**: 422-428

22 Lasmezas CI, Comoy E, Hawkins S, *et al.* Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* 2005; **365**: 781-783

23 Ono F, Terao K, Tase N, *et al.* Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis* 2011; **64**: 50-54

24 Holznagel E, Yutzy B, Schulz-Schaeffer W, *et al.* Foodborne transmission of bovine spongiform encephalopathy to nonhuman primates. *Emerg Infect Dis* 2013; **19**: 712-720

25 McDowell KL, Nag N, Franco Z, *et al.* Blood reference materials from macaques infected with variant Creutzfeldt-Jakob disease agent: vCJD Macaque Blood Reference Materials. *Transfusion (Paris)* 2015; **55**: 405-412

26 Lescoutra-Etchegaray N, Jaffre N, Sumian C, *et al.* Evaluation of the protection of primates transfused with variant Creutzfeldt-Jakob disease-infected blood products filtered with prion removal devices: a 5-year update. *Transfusion (Paris)* 2015; **55**: 1231-1241

27 Comoy EE, Mikol J, Jaffré N, *et al.* Experimental transfusion of variant CJD-infected blood reveals previously uncharacterised prion disorder in mice and macaque. *Nat Commun* 2017; **8**: 1268

28 Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005; **174**: 6477-6489

- 29 Berardi VA, Cardone F, Valanzano A, *et al.* Preparation of soluble infectious samples from scrapie-infected brain: a new tool to study the clearance of transmissible spongiform encephalopathy agents during plasma fractionation. *Transfusion (Paris)* 2006; **46**: 652-658
- 30 Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, *et al.* Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 1996; **77 (Pt 7)**: 1601-1609
- 31 Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, *et al.* Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 1999; **80 (Pt 11)**: 3035-3042
- 32 Barret A, Tagliavini F, Forloni G, *et al.* Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* 2003; **77**: 8462-8469
- 33 Groschup MH, Buschmann A. Rodent models for prion diseases. *Vet Res* 2008; **39**: 32
- 34 Douet JY, Zafar S, Perret-Liaudet A, *et al.* Detection of infectivity in blood of persons with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis* 2014; **20**: 114-117
- 35 Feraudet C, Morel N, Simon S, *et al.* Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 11247-11258
- 36 Langeveld JP, Jacobs JG, Erkens JH, *et al.* Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res* 2006; **2**: 19
- 37 Brandel JP, Heath CA, Head MW, *et al.* Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann Neurol* 2009; **65**: 249-256
- 38 Mead S, Wadsworth JDF, Porter M-C, *et al.* Variant Creutzfeldt-Jakob Disease With Extremely Low Lymphoreticular Deposition of Prion Protein. *JAMA Neurol* 2014; **71**: 340
- 39 Ryder SJ, Dexter GE, Heasman L, *et al.* Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res* 2009; **5**: 9
- 40 Chen CC, Wang YH. Estimation of the Exposure of the UK Population to the Bovine Spongiform Encephalopathy Agent through Dietary Intake During the Period 1980 to 1996. *PLoS One* 2014; **9**: e94020
- 41 Lasmezas CI, Cesbron JY, Deslys JP, *et al.* Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* 1996; **70**: 1292-1295
- 42 Klein MA, Frigg R, Flechsig E, *et al.* A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997; **390**: 687-690
- 43 Mabbott NA, Williams A, Farquhar CF, *et al.* Tumor Necrosis Factor Alpha-Deficient, but Not Interleukin-6-Deficient, Mice Resist Peripheral Infection with Scrapie. *J Virol* 2000; **74**: 3338-3344

Table 1: List of primates included in the present study. ^{1,2,3,4,5,6}The animals with the same superscript number received inocula of the same origin.

Primate	Inoculum	Dose	Incubation (months)	Clinical period (months)	Issue
#01	Brain ¹	0.04 mg	47	4	BSE
#02	Brain ¹	0.4 mg	30	3	BSE
#03	Clarified brain ²	10 mg	42	9	BSE
#04	Clarified brain ²	10 mg	45	12	BSE
#05	Clarified brain ²	10 mg	34	3	BSE
#06	Clarified brain ²	100 mg	33	2.5	BSE
#07	Clarified brain ²	100 mg	35	9	BSE
#08	Clarified brain ³	10 mg	42	3	Myelopathy
#09	Clarified brain ³	10 mg	47	3.5	vCJD
#10	Clarified brain ³	100 mg	33	7	vCJD
#11	Clarified brain ³	100 mg	33	5	vCJD
#12	Clarified brain ³	100 mg	32	6	vCJD
#13	Clarified brain ³	100 mg	29	8	vCJD
#14	Deleukocyted blood ⁴	40 ml	139	30	Myelopathy
#15	Deleukocyted RBCC ⁵	27 ml	30	2.5	Myelopathy
#16	Deleukocyted RBCC ⁵	27 ml	30	2	Myelopathy
#17	Plasma	23 ml	23	0.5	Myelopathy
#18	Plasma + buffy coat	40 ml	65.5	6	Myelopathy
#19	RBCC ⁶	24 ml	40	3.5	Myelopathy
#20	RBCC ⁶	24 ml	43	5	vCJD
#21	RBCC ⁶	24 ml	60	1	vCJD
#22	Whole blood ⁵	40 ml	50	2	BSE
#23	Whole blood	20 ml	32	4.5	Myelopathy
#24	Whole blood ⁴	40 ml	141	5	Myelopathy
#25	Whole blood	40 ml	29	8	Myelopathy
#26	Whole blood ⁶	40 ml	62	7	vCJD
#27	Whole blood	40 ml	62	4.5	vCJD

Table II: Disease patterns of transmission in immunocompetent Swiss and immunodeficient NSG mice after IC or IV exposure to primate inocula. Among 8 mice exposed per group, the vCJD or incomplete prion phenotypes observed are grouped as PrPres+ or PrPres- profiles as previously described[27].

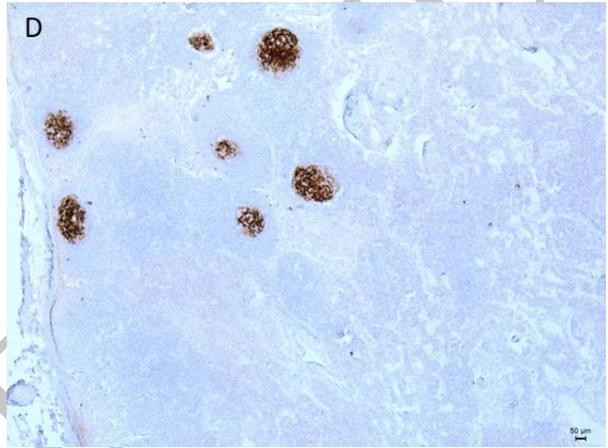
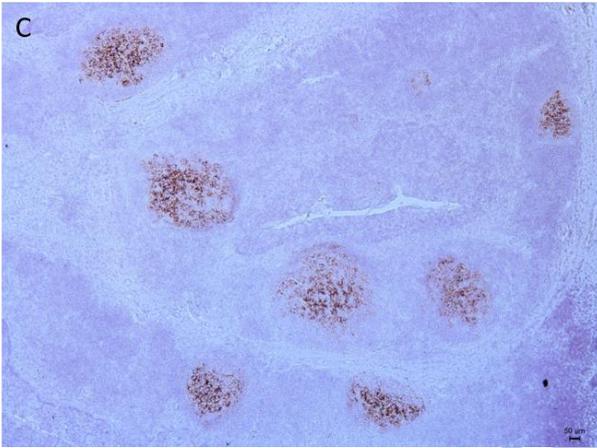
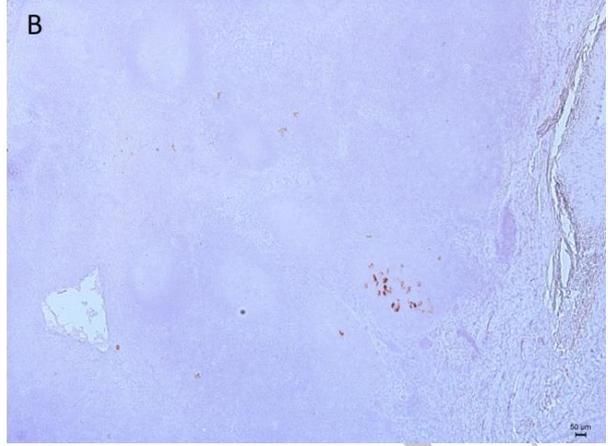
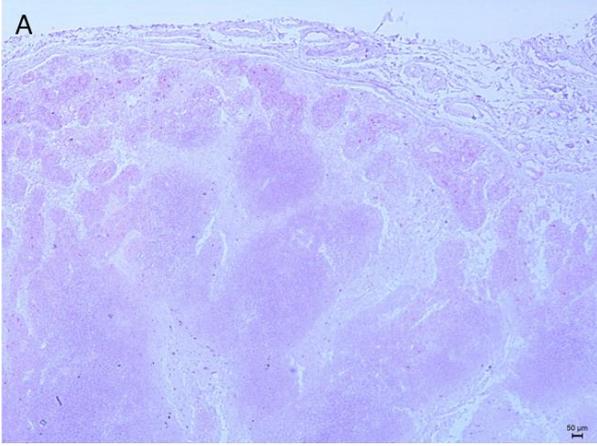
Primate inocula	Immunocompetent Swiss mice				Immunodeficient NSG mice			
	N	PrPres+	PrPres-	Healthy	N	PrPres+	PrPres-	Healthy
Intracerebral								
vCJD brain	22	100%	0%	0%	8	88%	13%	0%
Myelopathic #8 brain	10	0%	40%	60%	8	0%	38%	63%
Other myelopathic brains					31	0%	13%	87%
Intravenous								
vCJD brain	20	100%	0%	0%	8	0%	0%	100%
vCJD blood	222	2%	6%	92%	23	0%	4%	96%
Myelopathic brains					47	0%	4%	96%
Myelopathic blood	143	0%	6%	94%	24	0%	8%	92%
Healthy controls	60	0%	0%	100%	26	0%	0%	100%

Figures legends

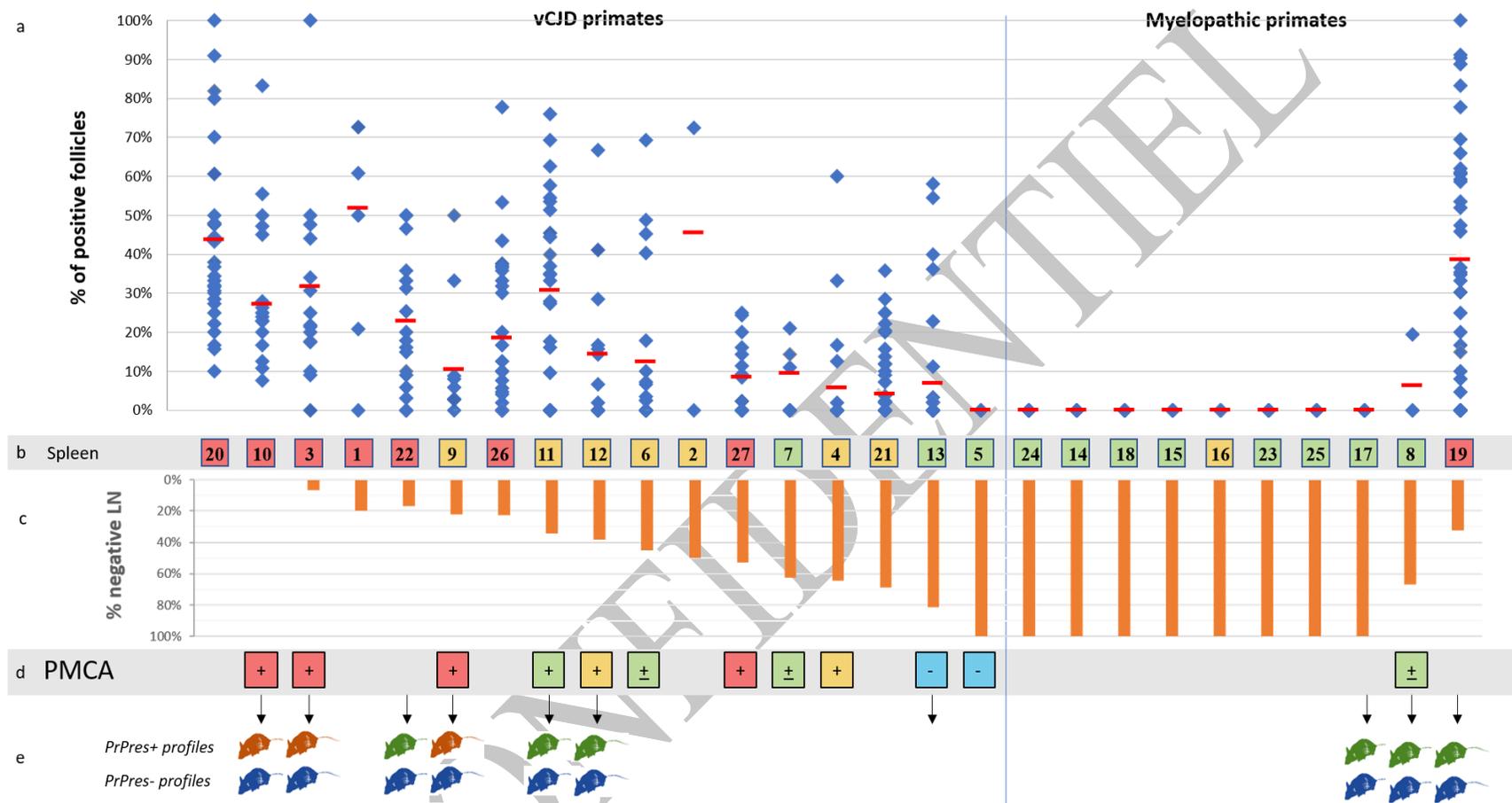
Figure 1: Immunodetection of abnormal prion protein, using 3F4 anti-PrP antibody, in peripheral lymph nodes of macaques exposed to BSE/vCJD infected inocula. In v-CJD macaques, the ratios of positive follicles in lymph nodes ranged from (A) no positive follicle (mesenteric lymph node, Macaque #5) or (B) few positive follicles (submaxillary lymph node, macaque #27) to (C) all the follicles to be positive (inguinal lymph node, macaque #20). In myelopathic primate #19, a strong PrP immunoreactivity was observed (axillary lymph node).

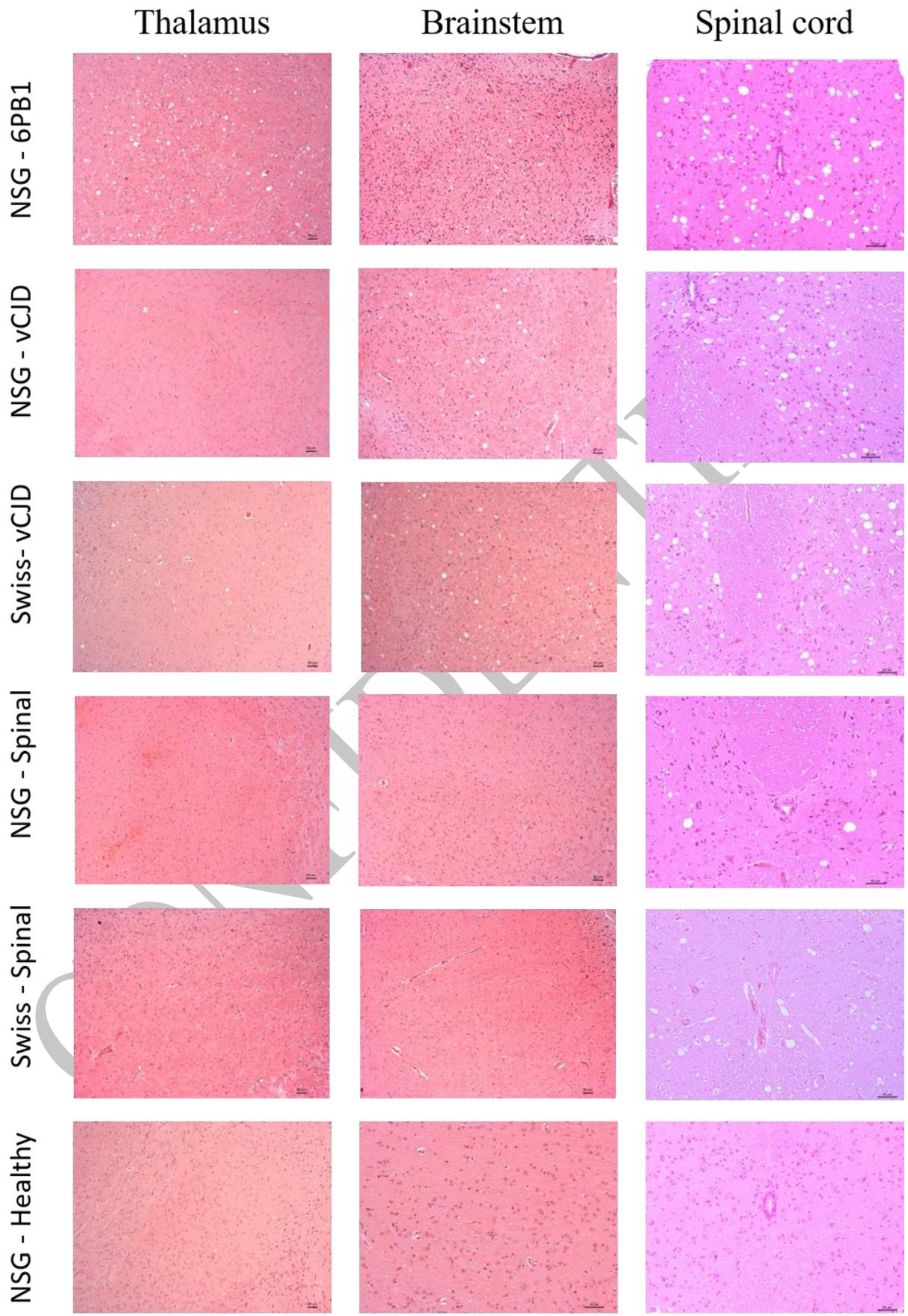
Figure 2: Apparent peripheral distribution of prions in primates experimentally infected through the intravenous route. For the 27 primates (17 vCJD and 10 myelopathic primates numbered in table I), A) the percentage of positive follicles was scored for each lymph node (blue diamonds). For each animal, the ratio of total positive follicles / total follicles is mentioned (red bar). B) An estimation of the amount of PrPres detected in spleen by ELISA was provided as a color code: green = negative (OD < limit of detection) – orange = low accumulation (limit of detection < OD < 1.500) – red: high accumulation (OD > 1.500). C) The percentage of negative lymph nodes is mentioned for each macaque. D) The results of PMCA analysis of buffy coat sampled at the terminal stage are provided as a color code: red = positive results after 3 rounds of PMCA; orange = positive results after 4 rounds of PMCA; green = positive or low positive after 5 rounds of PMCA; blue = negative after 5 rounds of PMCA. E) Transmissions in Swiss mice and in macaques (red animals: vCJD transmission; green animals: no vCJD transmission; blue animals: occurrence of PrPres⁺ prion diseases).

Figure 3: Spongiform changes in immunocompetent and immunodeficient mice. Examples of spongiform changes observed in NSG or Swiss mice exhibiting a vCJD or a spinal profile are presented, in parallel to control NSG mice exposed to brain homogenates derived from healthy animals or mice infected with the 6PB1 mouse adapted BSE strain. Hemalun-eosin staining of thalamus (x100), brainstem (x100) or spinal cord (x200).



CONFIDENTIAL





En parallèle de cet article, d'autres résultats complémentaires ont été générés.

Dans un premier temps, nous avons validé le caractère immunodéficient de notre modèle d'étude murin, NSG. Puis, nous avons procédé à des ré-inoculations (passages secondaires) d'homogénats cérébraux, spinaux et spléniques des souris NSG à d'autres modèles murins.

Dans un second temps, nous sommes allés plus loin dans l'analyse de la réplication périphérique en caractérisant différentes structures spléniques d'un large panel d'animaux (murins, simiens et ruminants).

2- Caractérisation du modèle d'étude : souris NSG

Au laboratoire, nous élevons au sein de notre animalerie une colonie de souris NSG. Leur caractère dommageable a conduit à un suivi individuel et particulier de ces animaux : gestion des plaies et des bagarres en isolant les animaux concernés avec mise en place de structures spécifiques d'enrichissement du milieu environnant dans la cage, autoclavage des aliments (préalablement irradiés) ainsi que du petit matériel (cages, grilles et biberons), système d'eau adoucie (filtrée à 22 micromètres) et de marche en avant afin de limiter les risques de contamination exogène. L'ensemble de nos souris (modèles transgéniques et conventionnels compris) est maintenu dans une animalerie de niveau de confinement 3 dotée d'un système de ventilation avec présence de filtres à particules aériennes à haute efficacité (HEPA) permettant de s'affranchir d'un hébergement sous isolateur des souris immunodéficientes. Les souris NSG sont maintenues dans une pièce qui leur est dédiée afin de préserver leur statut.

2.1 Matériels et méthodes

Modèle NSG

L'ensemble des expériences réalisées sur les modèles murins immunodéficients a été effectué en accord avec la réglementation européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins de recherche scientifique (Directive EU 2010/63) et approuvé par le comité d'éthique du CEA (CETEA, numéro 16-034).

Le modèle Non-obese diabetic (NOD) scid gamma (NSG) (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, Charles River) est caractérisé par une immunodéficiência sévère associée à une absence de lymphocytes B et T et la présence de cellules NK non fonctionnelles. Ces souris font l'objet d'un élevage interne et sont hébergées dans notre animalerie de niveau de confinement 3 (CEA-FAR) dans des conditions d'élevages contrôlées et agréées (température, cycle jour nuit, eau et nourriture à volonté).

Après euthanasie par surdosage de pentobarbital, la rate de souris NSG saines (non exposées à des souches de prion) a été prélevée sur différents animaux âgés entre 20 et 100 semaines (20 semaines, 40 semaines, 60 semaines et 100 semaines). Les organes ont ensuite été fixés dans une solution de formol 4% (VWR, MC3136136010) pendant 72 heures minimum pour analyses immunohistochimiques.

Immunohistochimie

Les rates ont été incluses en paraffine, puis à l'aide d'un microtome des coupes histologiques d'une épaisseur de 5 µm ont été réalisées. Les coupes ont été montées sur lames (Superfrost Plus, ThermoScientific) grâce à un bain d'étalement composé d'eau chauffée à 46°C. Une fois les coupes séchées à 37°C pendant une nuit minimum, elles ont été déparaffinées grâce à l'automate de coloration (Meditec histotechnic tissue stainer, TST40). À titre de contrôle, des coupes de rate de souris conventionnelles, C57Bl/6 et Swiss ont été utilisées.

Brièvement, les lames ont été passées dans différents bains successifs de cinq minutes chacun : trois bains de xylène, un bain d'alcool absolu, un deuxième à 96% et un dernier bain d'alcool à 70%. Un démasquage antigénique a ensuite été réalisé en chauffant les lames dans une solution de citrate à pH 6 pendant 20 minutes à 115°C. Après saturation, les lames ont été incubées dans la solution d'anticorps primaire (diluée en « Ab diluent », Ventana, 760-108). Les anticorps primaires ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante pour le protocole 1 ou toute la nuit à 4°C pour le protocole 2 (Tableau 19). Les anticorps secondaires ont été incubés sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Ces derniers dilués au 1/5000 reconnaissent les anticorps de souris (Impress mouse Vector, MP-7402) ou de lapin (Impress rabbit Vector, MP-7401). Après une révélation en DAB (Vector, 4105), une contre-coloration a été effectuée en hématoxyline-éosine (VWR, 00607121). Les coupes ont ensuite été déshydratées et montées entre lame et lamelle afin d'être observées au microscope.

Tableau 19 : Anticorps utilisés dans la validation du caractère immunodéficient des souris NSG.

Nom de l'anticorps (espèce reconnue)	Épitope reconnu	Fournisseur (Référence)	Concentration	Protocole (#)
CD45/B220 (lapin)	LB	BD Pharmingen (553086)	1/200	1
CD90 (souris)	LT	Southern Biotech (174001)	1/100	2
CD3e (souris)	LT/ NK	BD Pharmingen (553060)	1/100	2
FDC (lapin)	FDC	BD Pharmingen (551320)	1/500	1
CD21 (lapin)	LB, LT et FDC	BD Pharmingen (553817)	1/200	2

FDC : cellule dendritique folliculaire ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; NK : cellules natural killer.

2.2 Résultats

Observations expérimentales de souris NSG saines

La durée de vie des souris NSG, élevées au laboratoire, peut atteindre deux ans et demi ce qui est tout à fait cohérent avec les données fournies par la société Charles River. Cette espérance de vie, équivalente à celle retrouvée dans des modèles murins conventionnels, est compatible avec les longues périodes d'incubation décrites dans les maladies à prions.

De façon générale, il est admis que les souris immunodéficientes développent spontanément des tumeurs. Dans notre étude, six souris ont été exclues car elles présentaient des tumeurs invasives dans le SNC (vraisemblablement des lymphomes avec infiltration médullaire à confirmer à l'aide de marqueurs spécifiques). Sur un total de 200 souris prélevées et incluses pour analyse en IHC, 26 tumeurs ont été visualisées à l'autopsie, soit 13% des individus totaux. Les tumeurs ont été retrouvées au niveau sous cutané (n = 11), dans les vésicules séminales (n = 10), le poumon (n = 3) et le foie (n = 2). Elles ont toutes été prélevées pour analyses ultérieures. Ces animaux ne présentant pas d'infiltration tumorale dans le tissu nerveux ont été inclus dans notre étude. Les tumeurs ont été retrouvées aléatoirement dans des souris exposées à des homogénats issus de macaques sains, myélopathiques et vMCJ par voies IC et IV. Ainsi, aucune corrélation n'a été faite entre le développement de tumeur et la voie d'administration ni les souches inoculées.

Vérification du caractère immunodéficient de souris saines NSG

L'ensemble des rates des souris NSG prélevées ont été mesurées. En moyenne, elles ont une longueur de 1,1 cm \pm 0,3 une largeur de 0,3 cm \pm 0,1 et une hauteur de 0,2 cm \pm 0,1 (mesures réalisées sur 50 souris, volume de 10 mm³). Ces rates sont plus petites que celles observées chez les souris conventionnelles C57Bl/6 (volume de 70 mm³, Economopoulos *et al.*, 2011), signe d'une involution liée à une absence de fonctionnalité dans ce modèle immunodéficient. En parallèle, des souris NSG de différents âges ont été euthanasiées afin de vérifier, par immunomarquage, l'absence de cellules immunitaires en comparaison avec des souris conventionnelles (Figure 31 ; 32).

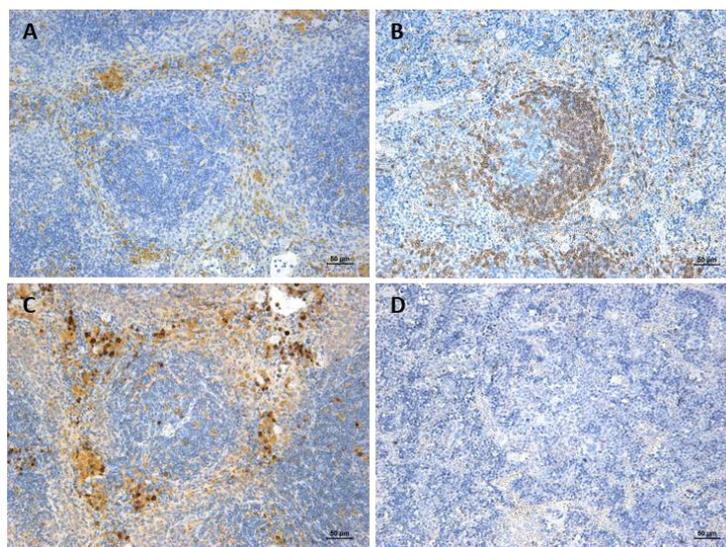


Figure 31 : Détection par immunohistochimie des cellules immunitaires dans une rate de souris immunocompétente (modèle C57Bl/6).

Immunodétection des lymphocytes T grâce à l'anticorps anti-CD3e (A), des lymphocytes B (anticorps anti-CD45, B) et des cellules dendritiques folliculaires (anticorps-anti-FDC, C). D) Absence de marquage dans la rate d'une souris immunodéficiente, NSG (anticorps anti-FDC) âgée de 60 semaines. Les cellules immunopositives sont visualisables en marron et les noyaux en bleu. Les barres d'échelles correspondent à 50 µm.

Évaluation descriptive de la réplication périphérique (étude A)

Les immunomarquages réalisés chez les souris NSG à différents âges (20, 40, 60 et 100 semaines) mettent en évidence une absence des marqueurs recherchés contrairement à ceux visualisés chez une souris conventionnelle (Figures 32). De plus, l'analyse des statuts sanitaires réalisée par une société indépendante du CEA (CNRS Orléans, UPS44, CDTA) souligne une absence d'immunoglobulines sécrétées chez ces souris (*résultats non montrés*). Enfin ces souris immunodéficientes sont tout à fait tolérantes aux xénogreffes de cellules iPS humaines²².

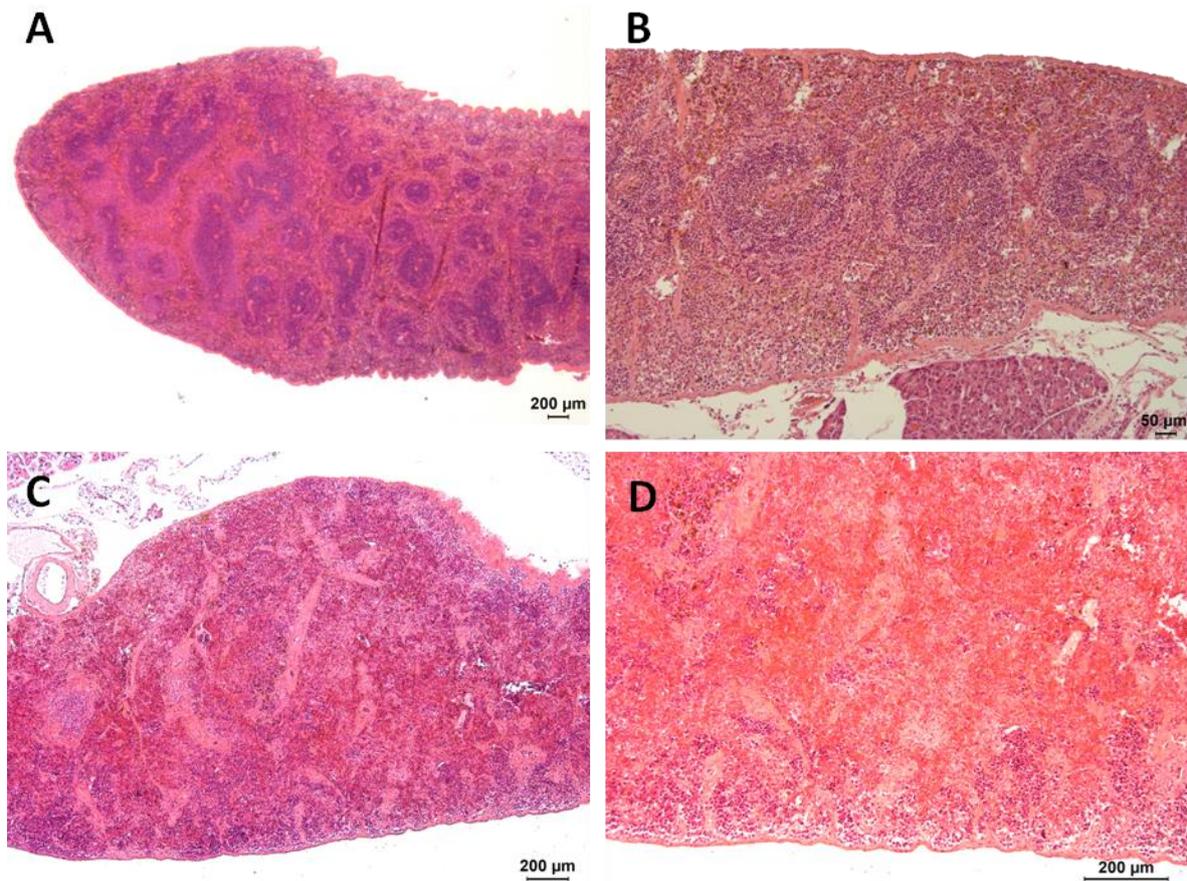


Figure 32 : Coloration splénique en hématoxyline-éosine de modèles murins immunocompétents et immunodéficients.
A - B) Souris immunocompétente (modèle Swiss). C-D) Souris immunodéficiente (modèle NSG) âgée de 100 semaines.

Ainsi, le caractère immunodéficient des souris NSG est confirmé chez des individus non exposés quel que soit l'âge de l'animal considéré. L'espérance de vie de ces souris, leur développement normal et viable est tout à fait compatible à une exposition de souches de prions.

²² Ces travaux seront présentés dans l'étude B (pages 140 - 178).

3- Vérification de la sensibilité des souris NSG aux souches de prions adaptées aux modèles rongeurs

Une fois le caractère immunodéficient des souris NSG validé, nous avons déterminé si ce modèle murin était permissif à des souches de prions. Pour cela, des inoculations intracébrales et intraveineuses ont été réalisées avec deux souches de prions adaptées à la souris et une troisième souche de vMCJ non adaptée. Ces résultats d'infection ont été comparés avec différents modèles murins conventionnels.

3.1 Matériels et méthodes

Inoculations intracérébrales et intraveineuses

Au total 20 souris NSG (élevage interne) âgées en moyenne de 6 à 10 semaines ont été inoculées par voie IC et 23 souris par voie IV.

Deux souches murines adaptées à la souris ont été utilisées : 6PB1 (souche d'ESB ; [Lasmez et al., 1997](#)) et C506M3 (souche de tremblante ; [Lasmez et al., 1996](#)). Une souche non adaptée a également été utilisée : issue d'un macaque infecté par l'agent de la vMCJ. L'ensemble des homogénats cérébraux ont été homogénéisés à 20% poids/ volume (p/v) dans une solution de glucose 5% et dilués extemporanément lors de l'inoculation.

Concernant les inoculations par voie IC, les souris ont tout d'abord été anesthésiées grâce à un mélange de kétamine (75 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg) par voie intra-péritonéale avant d'être inoculées dans le cortex pariétal droit (20 µl d'une solution à 1% dans du glucose p/v).

Concernant les inoculations par voie IV, les souris ont préalablement été placées sous une lampe chauffante pendant quelques minutes afin d'induire une vasodilatation et par conséquent une meilleure visualisation de la veine caudale. Un total de 200 µl d'homogénat (concentration finale de 0,1%) a ensuite été administré doucement.

Techniques de détection des marqueurs caractéristiques des maladies à prions

Les cerveaux, moelles épinières et rates ont été inclus pour moitié en formol 4% afin de réaliser des analyses histologiques. La spongiose a été mise en évidence par une coloration à l'hématoxyline-éosine et la démyélinisation grâce à la technique de Klüver-Barrera (coloration au *Luxol Fast Blue*). L'astroglie réactionnelle a été visualisée à l'aide de l'anticorps anti-GFAP. La recherche de PrP anormale a été effectuée avec un anticorps anti-PrP (Saf32, Spibio, A03202) de façon automatique au Ventana (Ventana NEXES Discovery). Cette étape est précédée d'un pré-traitement à la guanidine.

Une autre moitié des échantillons a été congelée afin de réaliser des analyses biochimiques. La recherche de PrP^{res} a été réalisée en ELISA (TeSeE bovine detection kit) selon les instructions du fabricant. La purification de la PrP^{res} a été effectuée sur des homogénats cérébraux (20% p/v) et 10% (p/v) pour la rate et la moelle épinière. Un traitement enzymatique à la PK a été réalisée (4 µg/mg) pendant 10 minutes à 37°C. La PrP^{res} a été détectée avec l'anticorps monoclonal, Saf32 (Spibio, A03202).

3.2 Résultats

Inoculations par voie intracérébrale

L'ensemble des souris conventionnelles (modèle Swiss) et immunodéficientes (modèle NSG) a développé une EST suite à l'exposition par voie centrale de souches adaptées ou de vMCJ. Les caractéristiques d'une maladie à prion ont été retrouvés à savoir spongieuse, gliose, accumulation de PrP anormale visualisable en IHC (Figure 33A) et la présence de PrP^{res} en ELISA (Figure 33B). Les souris ont également présenté des signes cliniques tels qu'un amaigrissement associé à un pelage hérissé, un changement de comportement (animal craintif et/ ou agressif/ hyperactif) ou encore des déplacements difficiles (pertes d'équilibre, paralysies des membres postérieurs).

Ainsi, tout comme les souris conventionnelles Swiss, le modèle NSG immunodéficient est sensible aux souches de prions par voie intracérébrale. Aucune anomalie n'a été mise en évidence lors de l'analyse *post-mortem* de la rate des souris NSG exposées (*résultats non montrés*) ni en immunohistologie (absence de dépôts anormaux de PrP) ni en biochimie (absence de PrP^{res}).

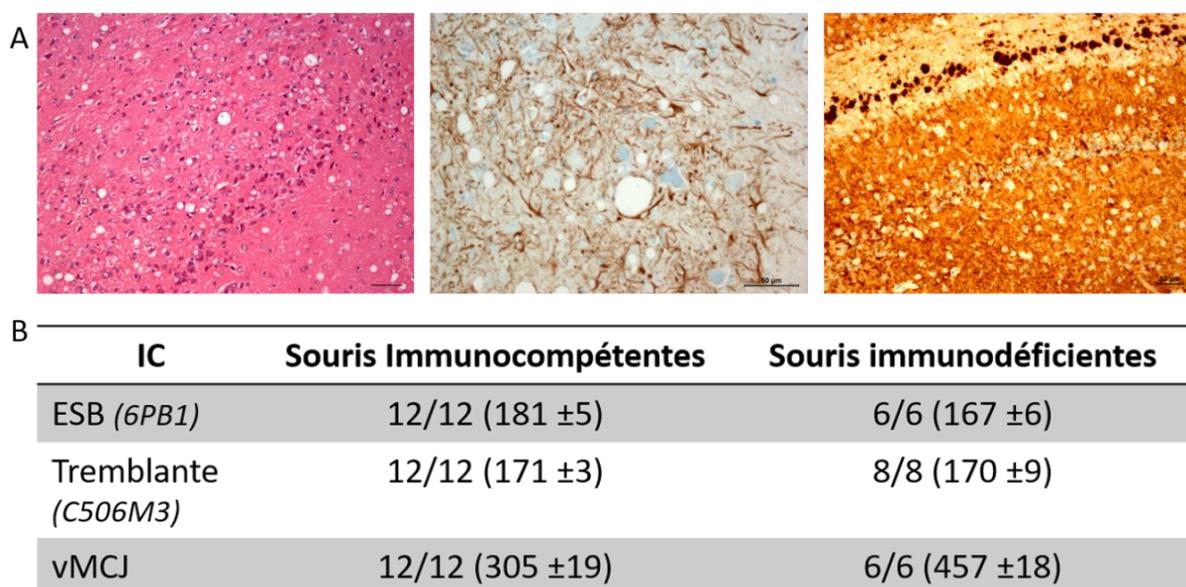


Figure 33 : Lésions caractéristiques d'une maladie à prions suite à une exposition centrale dans un modèle murin immunodéficient (Souris NSG).

A) Marqueurs neuropathologiques chez une souris NSG exposée à une souche d'encéphalopathie spongiforme bovine, 6PB1 : spongieuse (coloration à l'hématoxyline-éosine), astrogliose réactionnelle (anticorps anti-GFAP) et dépôts anormaux de protéine prion (anticorps anti-Saf32). B) Période d'incubation et présence de PrP^{res} détectée par ELISA dans des souris immunocompétentes (Swiss) et immunodéficientes (NSG). 6PB1 : souche d'ESB adaptée à la souris, C506M3 : souche de tremblante adaptée à la souris, vMCJ : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, homogénat issu d'un cerveau de macaque infecté par cet agent. Les barres d'échelles représentent 50 µm.

Inoculations par voie intraveineuse

Seules les souris exposées par voie IV à des souches de prions adaptées aux rongeurs ont développé une EST avec l'ensemble des marqueurs caractéristiques (Figure 34). Les souris immunodéficientes NSG exposées à l'agent de la vMCJ n'ont pas développé d'EST. Contrairement aux souris conventionnelles, la recherche de PrP^{res} et de dépôts anormaux dans la rate des souris NSG exposées par voie périphérique (IV) s'est avérée négative avec les techniques de détection classiques.

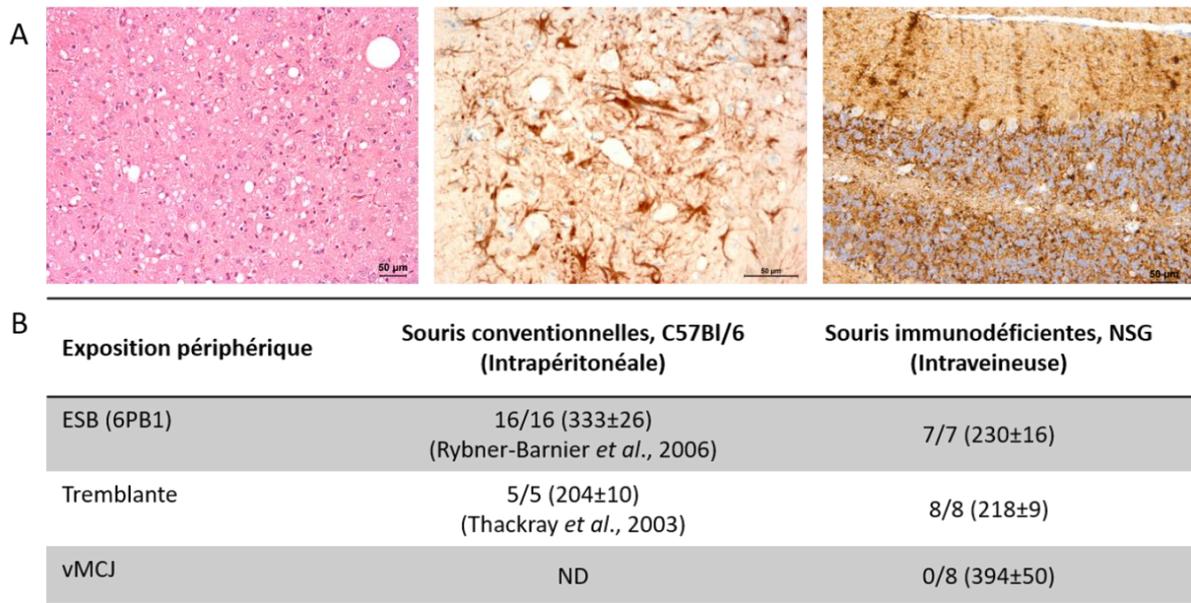


Figure 34 : Lésions caractéristiques d'une maladie à prions suite à une exposition périphérique dans un modèle murin immuno-compétent et -déficient.

A) Marqueurs neuropathologiques d'une souris NSG exposée à une souche d'encéphalopathie spongiforme bovine, 6PB1 : spongiose (coloration à l'hématoxyline-éosine), astrogliose réactionnelle (anticorps anti-GFAP) et dépôts anormaux de protéine prion (anticorps anti-Saf32). B) Période d'incubation et présence de PrP^{res} détectée par ELISA dans des souris conventionnelles (C57Bl/6) exposées par voie intrapéritonéale et immunodéficientes (NSG) exposées par voie intraveineuse. 6PB1 : souche d'ESB adaptée à la souris, C506M3 : souche de tremblante adaptée à la souris, vMCJ : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob issu d'un cerveau de macaque infecté par cet agent. Les barres d'échelles représentent 50 µm.

Nos résultats confirment la sensibilité du modèle immunodéficient NSG aux souches adaptées d'ESB et de tremblante par voies intracérébrale et intraveineuse (Figures 33 ; 34). Aucune souris immunodéficiente n'a développé de maladie à prions (dites « classiques ») suite à des inoculations de l'agent de la vMCJ par voie intraveineuse. En revanche, certaines de ces souris ont développé des syndromes atypiques similaires à ceux décrits dans les souris Swiss exposées aux mêmes inocula (Comoy *et al.*, 2017). Ces dernières données sont présentées dans l'article en préparation (Rontard *et al.*, 2017).

4- Passages secondaires : inoculations des homogénats des souris NSG exposées à des souris immunodéficientes et -compétentes

Ainsi, il a été mis en évidence que les souris NSG sont sensibles aux souches myélopathiques et développent des phénotypes atypiques caractérisés par une absence de PrP^{res} et la présence de spongiose dans la moelle épinière (formes spinales). En effet, les données présentées dans l'article (Rontard *et al.*, 2017 : en préparation) soulignent que les souches myélopathiques sont capables de transmettre un phénotype atypique indépendamment d'un système immunitaire fonctionnel.

Pour aller plus loin dans la compréhension des modes de transmission périphérique et la caractérisation de ces profils atypiques, des passages secondaires ont été réalisés. Différents homogénats (cérébraux, spinaux et spléniques) issus des souris NSG exposées ont été retransmis au même modèle immuno-déficient (souris NSG à souris NSG) et à des souris immunocompétentes (souris NSG à souris Swiss) (Figure 35).

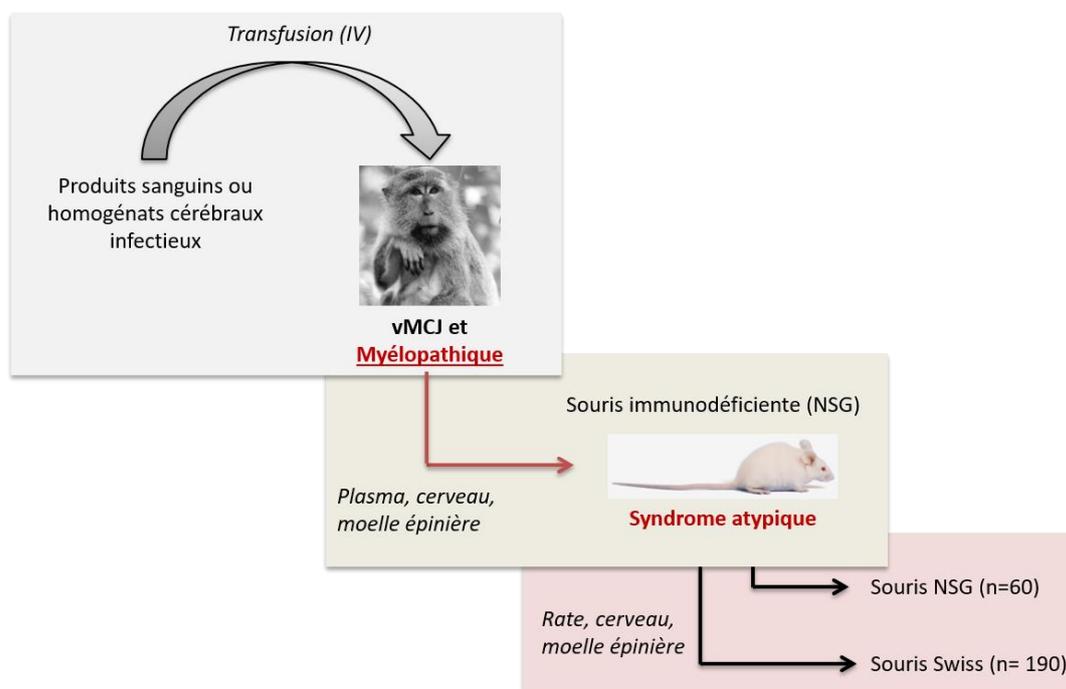


Figure 35 : Mode opératoire schématique des (re) transmissions *in vivo*.

4.1 Matériels et méthodes

Le même protocole d'inoculation par voies IC et IV que celui présenté dans l'article (Rontard *et al.*, 2017) a été utilisé. Les souris NSG et Swiss ont été inoculées avec différents homogénats issus de souris NSG préalablement exposées à des primates vMCJ et myélopathiques. Afin d'éviter toute confusion, les souris NSG exposées initialement (au cours du premier passage) seront qualifiées de « donneuses » dans la suite de cette étude.

Préparation des échantillons

L'ensemble des échantillons (cerveau, moelle épinière et rate) a été prélevé lors de l'autopsie des souris NSG (donneuses). Les cerveaux ont été homogénéisés à 20% poids/ volume (p/v) dans une solution de glucose 5% et dilués extemporanément lors de l'inoculation. La moelle épinière et la rate ont été homogénéisées à 10% p/v dans une solution de glucose 5% et diluées lors de l'inoculation.

Inoculations intracérébrales et intraveineuses

Au total 60 souris NSG (élevage interne) âgées en moyenne de 6 à 10 semaines ont été inoculées par voie IC. Les souris Swiss (Janvier) âgées en moyenne de 12 semaines ont été exposées par voies IC (n = 125 souris) et IV (n = 65 souris). Afin de limiter le nombre d'animaux, les souris Swiss contrôles exposées à des homogénats sains ont été inoculées en IC et en IV de façon simultanée.

4.2 Résultats

Transmissions secondaires au modèle immunodéficient

Un total de sept homogénats (trois cerveaux et quatre moelles épinières) distincts provenant des souris NSG donneuses a été inoculé à des souris NSG par voie IC (Figure 36). L'objectif est de réaliser une adaptation de souche en mettant en évidence une éventuelle PrP^{res}.

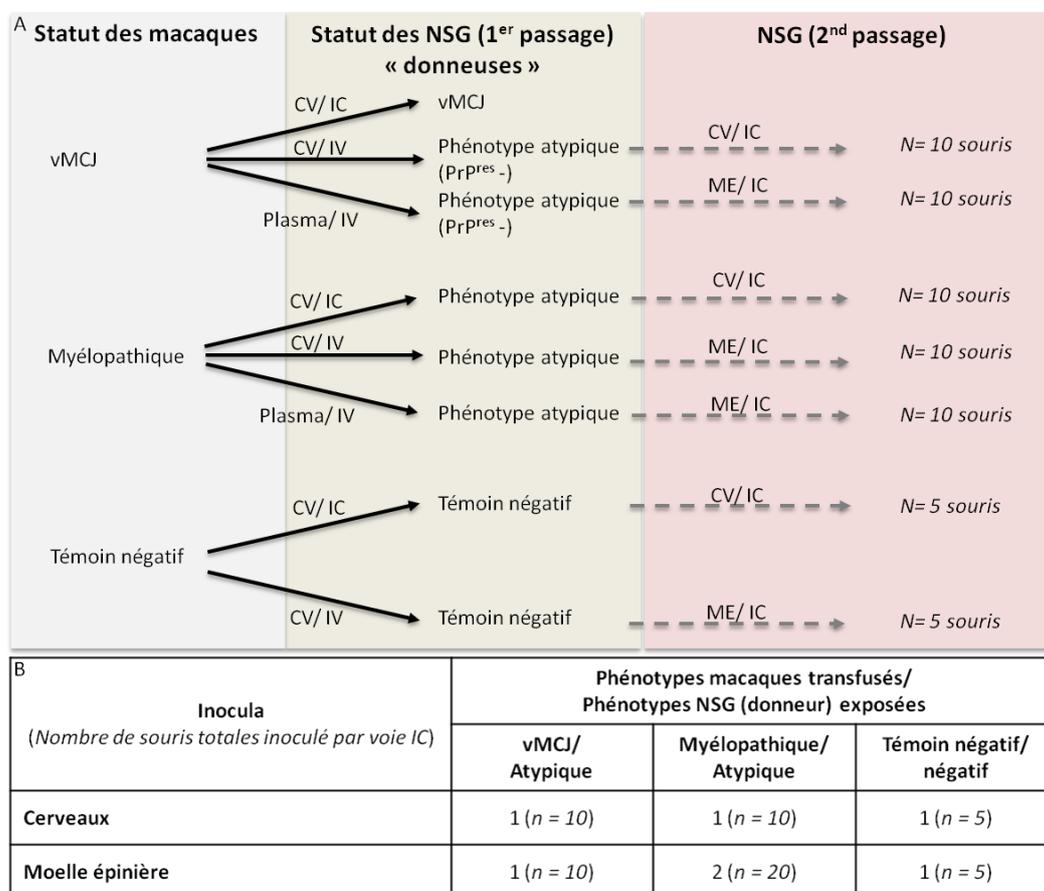


Figure 36 : Passages secondaires de souris immunodéficientes (NSG donneuses) à NSG.

A) Plan expérimental des inoculations à des souris NSG par voie intracérébrale à des homogénats cérébraux (cv : cerveau) et médullaires (me : moelle épinière). Ces derniers ont été prélevés à partir de souris NSG donneuses (vMCJ, atypiques ou saines). B) Nombre de condition inoculée aux souris NSG.

À titre de contrôle négatif, 10 souris ont été exposés à un homogénat cérébral (n=5) et spinal (n=5) provenant de souris donneuses initialement inoculées avec du cerveau de macaque sain (Figure 34). Lors de l'analyse *post-mortem*, ces dernières (dites donneuses) n'avaient aucune PrP^{res} détectable en ELISA. Elles ne présentaient pas de PrP anormale, ni de gliose en IHC ni même de spongiose lors du scoring sur la coloration des coupes cérébrales et spinales en HE.

En parallèle, cinq souris donneuses ont été sélectionnées suite au développement d'un phénotype atypique (spongiose dans la moelle épinière) après une exposition de souches myélopathiques. Le cerveau et/ ou la moelle épinière de ces dernières ont été ré-inoculées à 50 souris NSG (Figure 36).

Transmissions secondaires au modèle immunocompétent

Concernant les retransmissions des souris NSG (donneuses) aux souris Swiss, un total de 190 souris a été exposé (Figure 37).

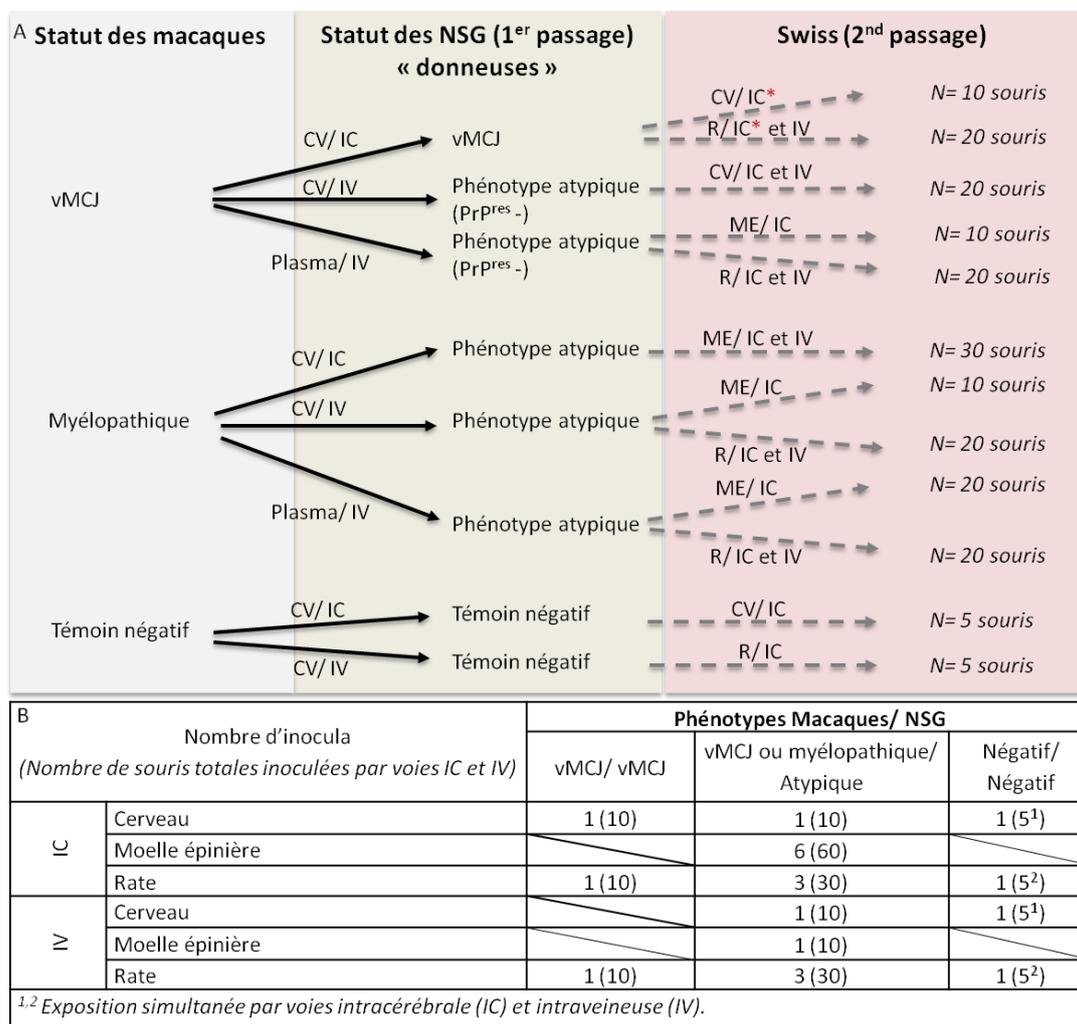


Figure 37 : Passages secondaires de souris immunodéficientes (NSG donneuses) à Swiss.

A) Schématisation expérimentale des souris Swiss exposées par voies intracérébrale (IC) et intraveineuse (IV) à des homogénats cérébraux (cv : cerveau), spinaux (me : moelle épinière) et spléniques (R : rate). Ces derniers ont été prélevés à partir de souris NSG, dites donneuses, présentant des atteintes de type vMCJ, atypiques ou saines. Les étoiles rouges (*) matérialisent les souris mortes et analysées à ce jour. B) Nombre de condition inoculée aux souris Swiss.

Les inoculations des souris NSG donneuses aux souris Swiss présentent deux différences majeures par rapport à celles réalisées aux souris NSG.

La première repose sur l'exposition d'une partie des souris par voie périphérique. L'objectif est de déterminer si les phénotypes atypiques observés chez les souris NSG donneuses sont transmissibles à un modèle murin conventionnel, comme cela a été décrit précédemment (Comoy *et al.*, 2017).

La seconde différence est l'inoculation d'homogénats spléniques. Lors du premier passage, ces rates ne présentaient aucun marquage de PrP anormale en IHC ni même de PrP^{res} en ELISA. Nous cherchons ainsi à confirmer ou infirmer si la rate, est le siège de la réplication périphérique pour les souches myélopathiques, comme cela est décrit dans les formes « classiques » de maladie à prion. En effet, une PrP anormale peut être présente en faible quantité dans la rate des souris immunodéficientes NSG, mais au vu de leur phénotype celle-ci n'ait pas pu conduire à une réplication périphérique détectable.

Deux autres hypothèses sont également envisageables : (i) implication d'un autre organe, non identifié à ce jour, comme support de la réplication périphérique ou encore (ii) une neuroinvasion directe et donc indépendante des organes périphériques.

Bilan de cette expérience à 300 jpe

A la date du 17/11/2017, les souris NSG et Swiss sont encore en cours d'incubation (moins de 300 jours post-exposition). Les résultats seront analysés ultérieurement et ne seront donc pas détaillés dans ce manuscrit. Notons que les souris mortes moins de 100 jpe ne sont pas prises en compte pour l'analyse finale des résultats car cette période d'incubation est trop courte pour le développement de ces phénotypes atypiques : ces animaux ne présentaient pas de signe clinique, ni de lésion notable à l'examen pathologique et la recherche en ELISA de PrP^{res} s'est avérée négative.

À ce stade, la seule mortalité observée concerne les souris Swiss inoculées par voies IC ou IV avec un homogénat cérébral provenant d'une souris NSG donneuse vMCJ, elle-même inoculée avec une souche de vMCJ (homogénat cérébral par voie IC) (Figure 37 : étoiles rouges).

Les souris Swiss inoculées par voie IC, mortes à 190 jpe \pm 10, présentent l'ensemble des caractéristiques des maladies à prions (signe clinique, gliose, spongiose et accumulation de PrP^{res}) (Figure 38).

En ce qui concerne les souris Swiss inoculées par voie IV (270 jpe \pm 20), elles présentent des périodes d'incubation attendues et correspondant à celles observées lors du phénomène d'adaptation de souche.

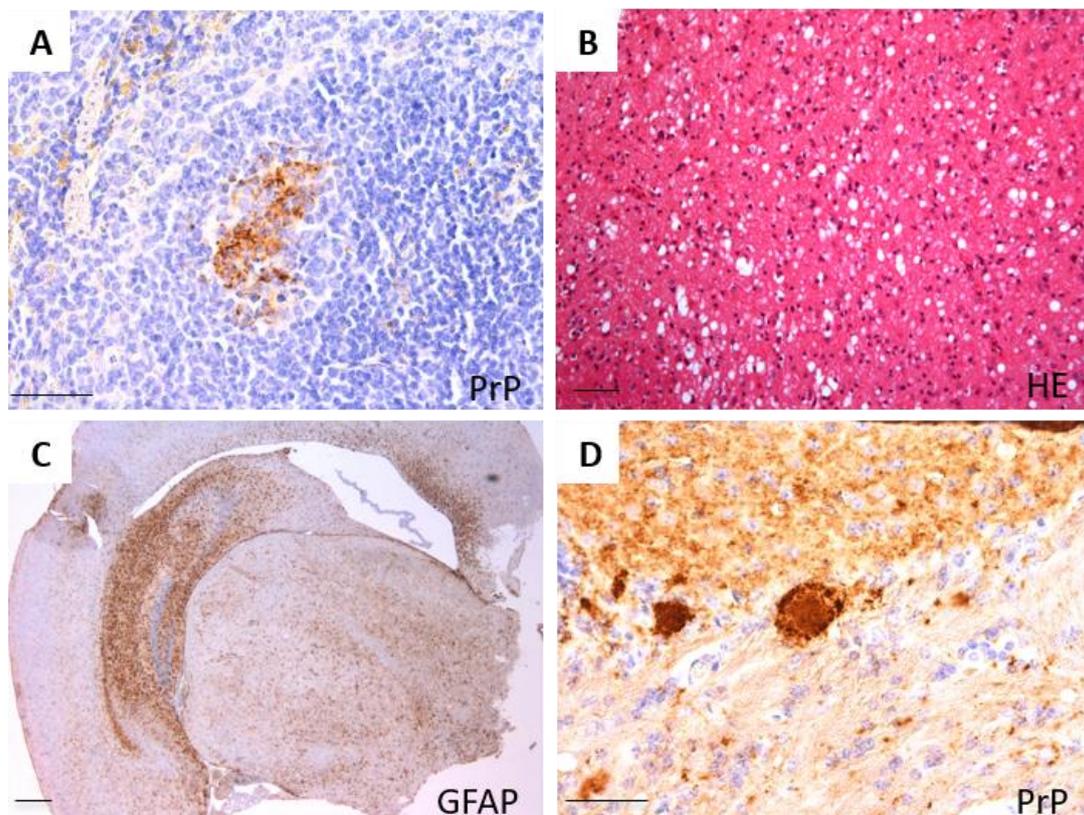


Figure 38 : Triade lésionnelle chez une souris Swiss inoculée par voie intraveineuse avec de l'homogénat cérébral de souris NSG exposée à un homogénat infectieux de macaque vMCJ.

A) Accumulation splénique anormale de PrP (Saf32). B) Spongiose cérébrale (Hématoxyline-éosine). C) Gliose cérébrale (GFAP). D) Accumulation cérébrale anormale de PrP (Sha31). Les barres d'échelle correspondent à 50 μ m pour l'image (A) et 200 μ m pour les images (B - D).

5- Étude descriptive des structures spléniques de plusieurs espèces

Après une exposition par voie IV, les macaques vMCJ présentent une réplication dans les organes lymphoïdes périphériques centrée sur les follicules lymphoïdes. À l'inverse ces structures ne présentent aucune accumulation détectable chez les macaques myélopathiques avec les techniques classiques (Figure 39).

De façon simultanée aux inoculations *in vivo* présentées précédemment, des optimisations de nos protocoles IHC de détection des isoformes anormaux de la PrP ont été effectuées au sein du laboratoire. Ces derniers montrent chez les macaques transfusés vMCJ une accumulation ectopique de la PrP anormale dans le parenchyme splénique (plus précisément autour des vaisseaux, périvasculaires, PV Figure 39) en parallèle de celle classiquement retrouvée dans les structures immunitaires. Ce marquage est également observé chez les patients humains vMCJ. Concernant les macaques transfusés développant une myélopathie, seul le marquage ectopique est présent (Figure 39B).

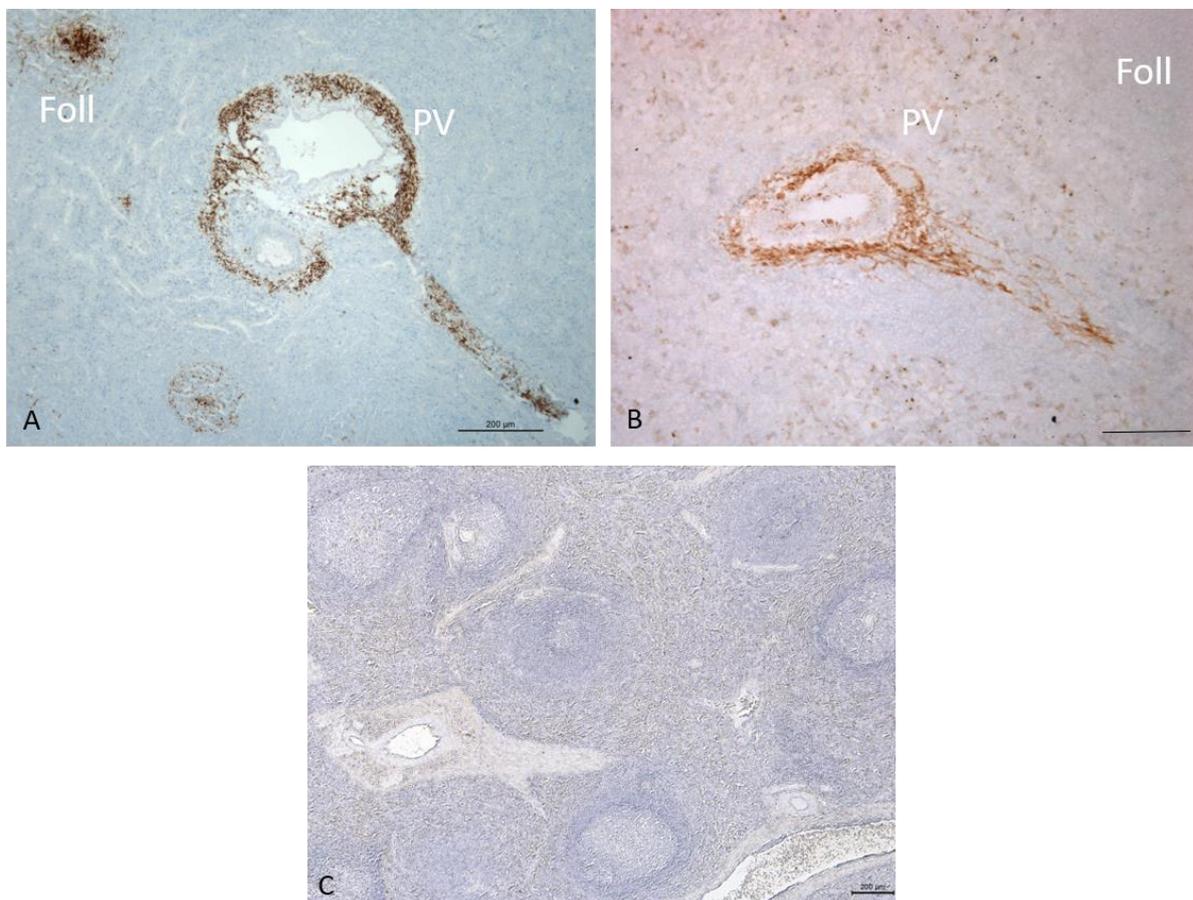


Figure 39 : Accumulation anormale de PrP dans le splène de macaques transfusés.

Immunodétection de la protéine prion anormale grâce à l'anticorps anti-Sha31 chez A) un macaque atteint d'une forme classique de maladie à prion et B) un macaque atteint d'un syndrome myélopathique. C) Absence de marquage chez un macaque sain. Foll : follicule (structure immunitaire). PV : périvasculaire (structure non immunitaire). Les barres d'échelle représentent 200 µm.

Cette dernière partie a consisté en l'analyse de rates de plusieurs espèces (primates, ruminants et rongeurs) dont les principales structures anatomiques sont présentées dans la figure 40.

L'objectif est double : (i) caractériser les structures présentant un marquage ectopique de PrP anormale et (ii) mettre en évidence des différences anatomiques entre les espèces pouvant expliquer l'expression différentiel des souches en fonction des modèles.

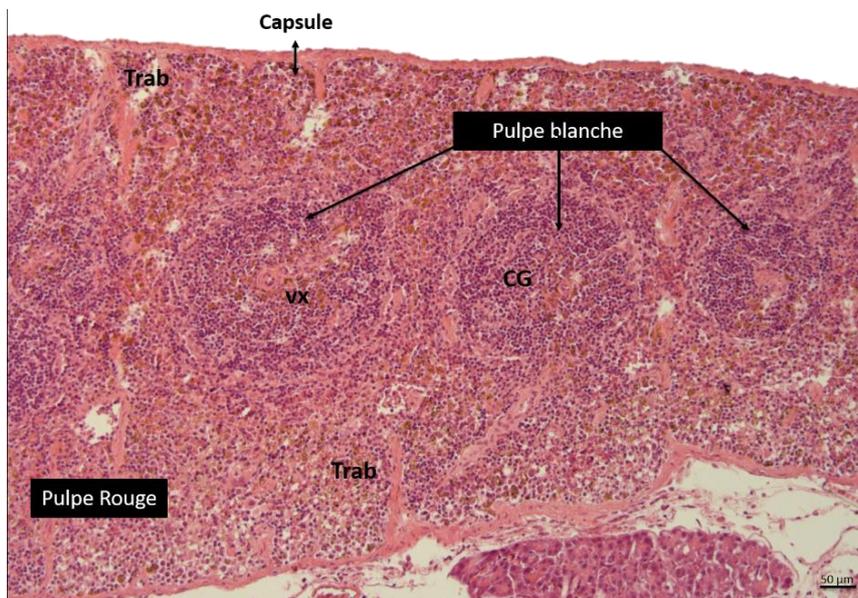


Figure 40 : Principales structures anatomiques de la rate.

La rate est composée de deux structures distinctes : la pulpe blanche regroupant les manchons péri-artériolaires (vx) et les centres germinatifs (CG) et la pulpe rouge constituée de sang (larges vaisseaux, sinusoides veineux). La rate est délimitée aux extrémités par une capsule splénique d'où partent les trabécules (encore appelées travées) constituées de vaisseaux. Coloration Hématoxyline-éosine d'une coupe transversale de rate de souris conventionnelle, modèle Swiss.

5.1 Matériels et méthodes

Immunohistochimie

Le même protocole présenté page 117 a été appliqué aux rates de différentes espèces. Les anticorps utilisés sont présentés dans le tableau 20. Les anticorps primaires sont incubés pendant 1 heure à température ambiante. En amont du démasquage antigénique, l'activité des peroxydases a été bloquée. Pour cela, les lames ont été incubées pendant 20 minutes en H_2O_2 (Merck, K45302609418), puis rincées trois fois en eau distillée avant incubation de l'anticorps primaire. L'ensemble des étapes suivantes est identique au protocole détaillé précédemment.

Tableau 20 : Liste des anticorps utilisés par la caractérisation des rates.

Nom de l'anticorps (espèce reconnue)	Épitope reconnu	Fournisseur (Référence)	Concentration
Bin-1 (lapin)	Bridging Integrator 1	Abcam (ab27796)	1/500
CD271 (lapin)	Récepteur anti-p75 (facteur de croissance nerveuse)	Abcam (AB52987)	1/200
Podoplanine (souris)	Cellules stromales	BioLegen (127407)	1/200
Sha31 (souris)	PrP ^C (145-152)	Spibio (A03213)	1/5000
Saf32	PrP ^C (59-89)	Spibio (A03202)	1/5000
SMA (souris)	Actine des muscles lisses	Dako (M0851)	1/1000

PrP : protéine prion ; SMA : l'actine du muscle lisse.

Coloration à l'orcéine modifiée

Cette technique de coloration permet de visualiser les fibres et les lames élastiques. De façon plus précise, l'orcéine est un colorant faible capable de se fixer avec une grande électivité (c'est-à-dire de manière non spécifique) sur les fibres élastiques. Après déparaffinage, les coupes histologiques sont incubées de 30 minutes à 24 heures dans la solution d'orcéine. Différents protocoles ont été utilisés (orcéine chlorhydrique, nitrique et modifiée) et des optimisations ont été réalisées sur les temps d'incubation (Tableau 21).

La solution d'orcéine est constituée d'orcéine (Merck, 1071000025), d'acide chlorhydrique (HCl, Normapur Prolabo) et d'éthanol à 70% (Tableau 21). Cette solution est portée à ébullition afin de dissoudre l'orcéine. Elle peut être conservée plusieurs mois à température ambiante. Concernant le protocole d'orcéine nitrique, l'HCl est remplacé par de l'acide nitrique (Normapur Prolabo). Les coupes sont ensuite rincées abondamment à l'eau courante avant d'être déshydratées et montées entre lames et lamelles. En microscopie, les fibres élastiques sont de couleur rouge violacé à brun noir.

Tableau 21 : Présentation des différents protocoles d'orcéine.

Nom du protocole	Composition de la solution d'orcéine ¹	Temps d'incubation optimisé (heures)
Orcéine chlorhydrique	0.6 ml d'HCl concentré	4h
Orcéine nitrique	2 ml d'acide nitrique	1h
Orcéine modifiée	1ml d'HCl concentré/ pH ajusté à 1,2	2h30

¹Les solutions d'orcéine présentées, quel que soit le protocole, sont présentées pour 1 gramme d'orcéine, dans un volume final de 100 ml dans de l'éthanol à 70%.

Le protocole d'orcéine modifiée permet de mettre en évidence la présence d'inclusion cytoplasmique après oxydation par le permanganate de potassium en milieu acide. Les protéines soufrées oxydées en sulfonate réagissent avec l'orcéine. Les coupes sont incubées pendant cinq minutes en permanganate de potassium sulfurique (pour un volume final de 100 ml d'eau distillée, 1,5 g de permanganate de potassium et 1,5 ml d'acide sulfurique sont ajoutés). Les lames sont rincées abondamment à l'eau courante puis rapidement blanchies (moins d'une minute) dans une solution d'acide oxalique à 1% préalablement filtrée (10 g d'acide oxalique dans 1 L d'eau distillée). Les lames sont ensuite incubées dans la solution d'orcéine (dont le pH est ajusté à 1,2 grâce à l'ajout de soude) et rincées à l'eau courante avant d'être déshydratées. En microscopie, les fibres sont de couleur rouge violacées et le fond est brun clair.

5.2 Résultats

Caractérisation de la structure périvasculaire chez les macaques transfusés

Nos mises au point de la coloration à l'orcéine nous ont permis de déterminer des temps d'incubation optimaux selon le protocole à savoir quatre heures pour l'orcéine chlorhydrique (ou classique), une heure pour l'orcéine nitrique et deux heures et demie pour l'orcéine modifiée (Tableau 21). Ces trois protocoles permettent de visualiser les mêmes structures. Toutefois, le protocole de l'orcéine modifiée permet d'obtenir un meilleur contraste entre le fond et les fibres élastiques, et a donc été appliqué à l'ensemble des caractérisations spléniques (Figure 41). De la même façon, différentes optimisations ont été réalisées afin d'obtenir des marquages satisfaisants avec les anticorps anti-CD271 et podoplanine (résultats des optimisations non montrés).

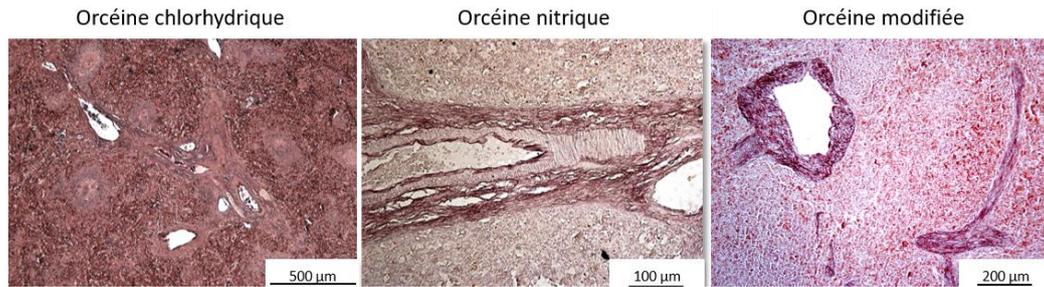


Figure 41 : Caractérisation des structures spléniques périvasculaires par coloration à l'orcéine chez un macaque sain.

L'analyse des rates de macaques vMCJ met en évidence une accumulation de PrP anormale en périvasculaire (Figure 39). Nos résultats soulignent que l'orcéine (Figure 42C) et le marqueur SMA (Figure 42B) marquent cette structure d'intérêt (Figure 42). En parallèle, il a été mis en évidence que cette structure n'était pas constituée de cellules immunitaires : absence de lymphocytes B et T (résultats non montrés). De même, cette structure n'est pas caractérisée par l'implication de cellules mésenchymateuses nouvellement décrites par l'équipe de Steiniger (CD271, Figure 42D) (Steiniger *et al.*, 2014) ni marquée par l'anticorps Bin-1 spécifiques des filaments d'actine (Figure 42E) ni spécifique des protéines du système lymphatique (Figure 42F).

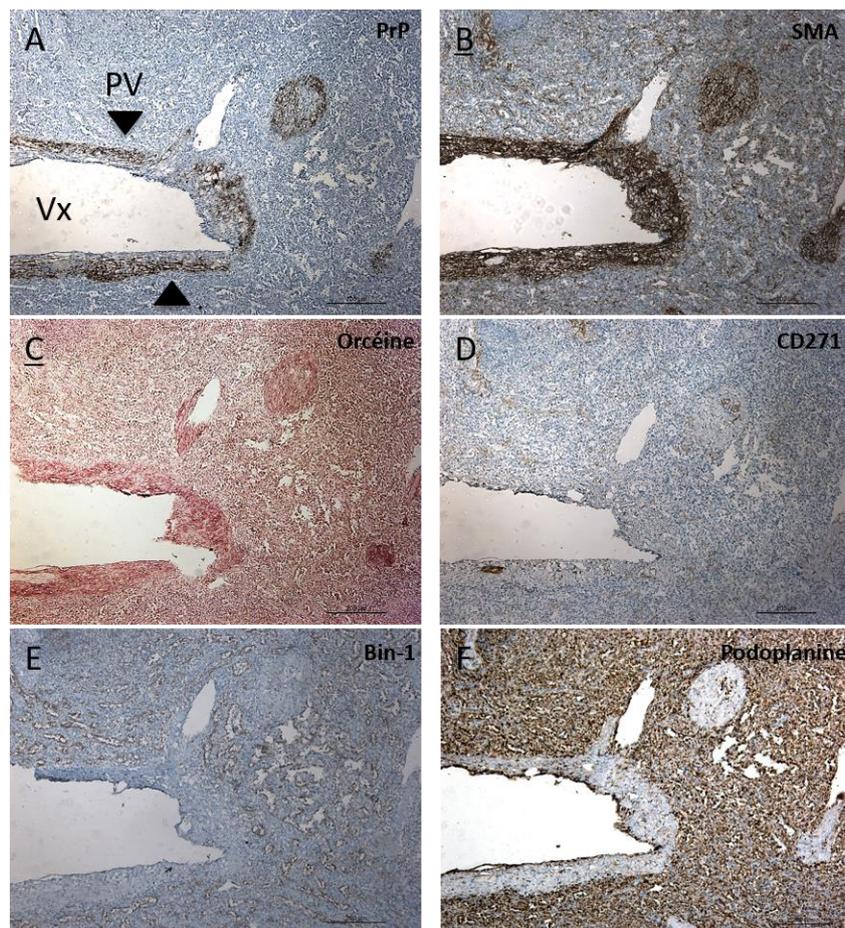


Figure 42 : Immunomarquage de la région périvasculaire chez un macaque vMCJ.

A) Accumulation anormale de protéine prion autour des vaisseaux sanguins (Vx) en périvasculaire (PV) matérialisée par des flèches noires (marquage marron). B) Les muscles de l'actine lisses (anticorps anti-SMA) révèlent cette structure périvasculaire. C) La coloration à l'orcéine modifiée met en évidence les fibres élastiques dans cette structure d'intérêt. D) Absence de marquage de la zone d'intérêt par les anticorps anti-CD271 (cellules stromales), anti-Bin-1 (E) et anti-podoplanine (F). Les barres d'échelle représentent 200 µm.

Description de structures spléniques dans différentes espèces

Dans un second temps, nous avons comparé différentes espèces à l'aide de ces deux marqueurs (Figure 43 ; 44). Cette analyse a été initiée sur des rates provenant de :

- Primates : babouin, Homme, Macaque, microcèbe ;
- Ruminants : brebis, bovin, chèvre ;
- Rongeur : hamster, souris.

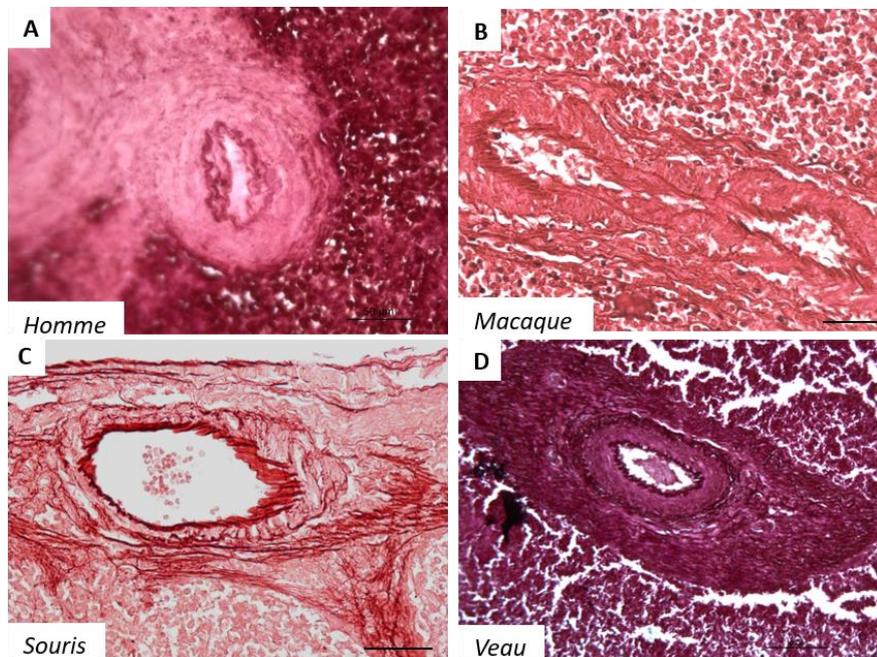


Figure 43 : Caractérisation des structures spléniques périvasculaires grâce à la coloration à l'orcéine.

Colorations à l'orcéine modifiée chez A) l'Homme, B) le macaque cynomolgus C) la souris conventionnelle, C57Bl/6 D) le veau. Les barres d'échelle correspondent à 50 μm (A – C) et 100 μm pour l'image (D).

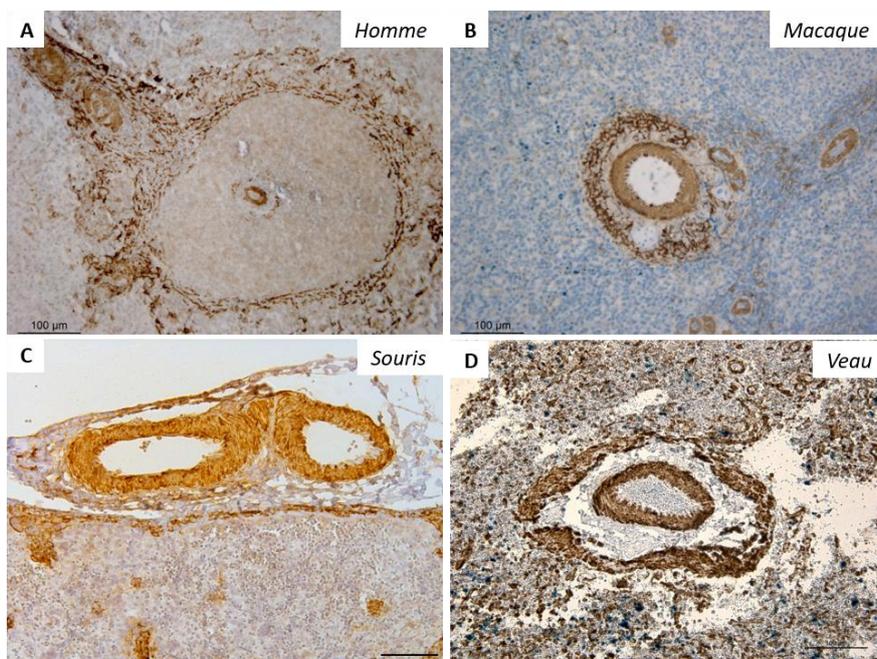


Figure 44: Immunodétection des muscles lisses de l'actine en périvasculaire.

Immunomarquages de la rate chez A) l'Homme, B) le macaque cynomolgus C) la souris et D) la chèvre (Anticorps anti-SMA). Les barres d'échelles représentent 100 μm .

Grâce à ces deux marqueurs et à l'analyse morphologique en HE une série de différences anatomiques a été mise en évidence. Concrètement, trois structures spléniques ont été observées : la capsule, la pulpe rouge (notamment les trabécules ou travées) et la pulpe blanche (particulièrement les follicules) (Figure 39).

En résumé, les souris tout comme le hamster et l'Homme présentent une capsule peu épaisse en comparaison des primates (babouin, macaque et microcèbe). Ils possèdent également peu de fibres élastiques.

Les souris ont beaucoup de follicules par rapport à la proportion de la pulpe rouge. Inversement les ruminants (chèvre, brebis et vache) ont peu de follicules (proportion de la pulpe blanche faible) et une capsule épaisse.

L'aspect anatomique de la rate du babouin est très différent de celui du macaque. Le babouin a peu de fibres élastiques et la pulpe rouge est très structurée. Le microcèbe, intermédiaire entre le babouin et le macaque, a une capsule épaisse et peu de fibres musculaires autour des vaisseaux. Les primates ont plus de structures lymphoïdes que les ruminants.

La structure anatomique de la rate humaine est proche de celle du macaque à l'exception des structures trabéculaires qui sont très importantes chez l'Homme par rapport aux autres espèces.

Ces données reposent sur des analyses morphologiques préliminaires, mais elles soulignent toutefois des dissimilitudes anatomiques entre les espèces pouvant être à l'origine de fonctions physiologiques et de mécanismes de réplication périphérique de l'agent différents.

6- Discussion de l'étude A : Étude de la réplication périphérique

L'ingestion d'aliments contaminés par l'agent responsable de l'ESB a conduit à l'apparition de 228 cas avérés de vMCJ chez l'Homme. Les dernières données épidémiologiques font état d'un déclin de l'incidence des bovins infectés et des patients vMCJ permettant ainsi d'affirmer que ce mode de contamination est maîtrisé. Toutefois, il persiste actuellement un risque de santé publique lié à la transmission iatrogène de la vMCJ par transfusion sanguine. Dès que le caractère transmissible de l'agent a été mis en évidence, de nombreuses études ont souligné la présence d'infectiosité contenue dans le sang. Ces données se sont vérifiées suite au recensement de trois cas de vMCJ post-transfusionnels au RU portant à 231 le nombre total de cas. Contrairement au risque primaire, la transmission interhumaine, via le sang ou ses dérivés, pourrait s'avérer beaucoup plus aisée dans la mesure où l'agent infectieux est d'ores et déjà adapté à son hôte. Le risque est accentué par : (i) l'absence de technique de détection de l'agent infectieux appliqué en routine lors des dons de sang et (ii) la prévalence probablement plus importante que prévue de porteurs asymptomatiques.

Depuis de nombreuses années, le laboratoire évalue expérimentalement le risque primaire chez le macaque cynomolgus. Ce modèle, permissif à la majorité des souches humaines et animales, a permis des avancées majeures dans le domaine des prions. La plus significative d'entre elles reste la confirmation du lien entre l'agent de l'ESB et les cas cliniques humains de vMCJ ([Lasmézas et al., 1996](#)). Au sein du laboratoire, des transfusions chez le macaque cynomolgus en respectant le ratio poids/ volume des actes transfusionnels pratiqués chez l'Homme ont été réalisées, afin d'évaluer le risque de contamination secondaire.

Une partie des macaques transfusés avec des produits sanguins infectés par l'agent de la vMCJ développe une EST répertoriant l'ensemble des caractéristiques décrites chez l'Homme ([Lescoutra-Etchegaray et al., 2015](#) ; [Comoy et al., 2017](#)). En parallèle, un nombre plus important d'individus a développé un syndrome myélopathique ([Lescoutra-Etchegaray et al., 2015](#) ; [Comoy et al., 2017](#)). Ce dernier, transmissible à la souris conventionnelle, est caractérisé par des atteintes médullaires ainsi qu'une absence de PrP^{res} avec les techniques classiques de détection aussi bien dans le système nerveux central (encéphale et moelle épinière) que dans la rate.

Au regard de ces formes atypiques, l'un des objectifs de mon projet doctoral a été de déterminer si la rate pouvait toutefois être le lieu de la réplication périphérique lors d'une exposition par voie intraveineuse notamment chez les macaques myélopathiques. Cela nous a conduit à deux principales analyses :

- Étudier l'implication du système immunitaire dans l'apparition de phénotype atypique grâce à l'exposition par voie intraveineuse de souris immunodéficientes ;
- Caractériser les structures spléniques impliquées dans les mécanismes de réplication périphérique chez les macaques transfusés.

6.1 Étude de la réplication périphérique grâce aux souris NSG

Caractérisation du modèle d'étude murin, NSG

Environ 10% de nos souris NSG, élevées en interne, ont développé des tumeurs notamment dans les vésicules séminales. En comparaison, à d'autres modèles immunodéficients, ce pourcentage reste faible comme le confirme plusieurs données ([Ishikawa et al., 2005](#) ; [Shultz et al., 2005](#)).

Les souris présentant des infiltrations tumorales dans la moelle épinière ou le cerveau ont été exclues de l'étude afin de prévenir tout risque de résultats incohérents en termes de spongiose et de marquages artéfactuels avec la PrP. Nos données descriptives n'ont pas mis en évidence de corrélation entre l'apparition de tumeur et la voie d'administration. Néanmoins face au faible nombre d'animaux analysés, ces travaux mériteraient d'être confirmés par un nombre plus conséquent d'animaux.

Des études récentes suggèrent un rôle de la PrP^C dans les processus tumoraux (Antony *et al.*, 2012 ; Xin, Sy, et Li, 2013 ; Costa *et al.*, 2016). Pour aller plus loin dans cette analyse, il serait intéressant de réaliser des marquages PrP dans ces coupes de tumeurs et déterminer en biochimie le ratio des différents fragments de la PrP^C. L'objectif serait de vérifier si, dans le contexte d'une infection prion en fonction des inocula et selon la théorie de la perte de fonction de la PrP^C, des différences de répartition ou de disponibilité de cette dernière puissent être observées dans ces tumeurs.

La recherche de différents marqueurs de cellules immunitaires dans la rate des souris NSG a permis de confirmer leur caractère immunodéficient. Une déplétion en LB, LT, NK et FDC a été retrouvée dans la rate des souris non exposées et ceci même chez des individus âgés de plus de deux ans. Ces marquages ont également été effectués sur des souris exposées à des homogénats sains par voies IC et IV. Ces vérifications sont nécessaires dans la mesure où le modèle murin NSG est capable de générer spontanément des clones B et T. En effet, avec l'âge ces souris peuvent présenter un phénomène dit de « *leakiness* » c'est-à-dire un développement de réactivité immunitaire partielle et spontanée avec génération de lymphocytes B et T. En perspectives, il serait pertinent de réaliser ces vérifications pour les souris exposées expérimentalement à des souches de prion (adaptées à la souris, vMCJ et myélopathiques). Bien que cette hypothèse soit peu probable, il serait envisageable d'avoir une génération de cellules immunitaires suites à l'exposition de différents inocula infectieux ou de dérivés sanguins (présence de cellules immunitaires circulantes). Dans le cadre de notre étude de réplication des souches atypiques indépendamment d'un système immunitaire fonctionnel, nous ne pouvons pas conclure à une absence de génération de LB et T au cours du vieillissement des souris exposées. Toutefois, nous émettons l'hypothèse que la réplication périphérique de la PrP anormale a lieu précocement, et donc indépendamment, des potentiels clones de cellules immunitaires générés.

Exposition des souris NSG à des homogénats infectieux « classiques »

Par voie intracérébrale, les souris NSG exposées à des souches de prions adaptées (ESB et tremblante) ou encore à l'agent de la vMCJ ont développé une EST avec les marqueurs caractéristiques. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature stipulant que les souris immunodéficientes sont sensibles à une exposition centrale (Kitamoto *et al.*, 1991 ; O'Rourke *et al.*, 1994 ; Fraser *et al.*, 1996 ; Lasmézas *et al.*, 1996 ; Klein *et al.*, 1997 ; Mabbott *et al.*, 2000). Les souris NSG ont présenté des périodes d'incubation similaires à celles retrouvées chez les souris immunocompétentes (environ 172 ± 6 jpe). Ainsi, bien que le modèle NSG présente une immunodéficiência sévère, il reste sensible à des souches de prions adaptées. En revanche, dans le cadre du passage primaire de la vMCJ, les souris NSG exposées par voie IC à des échantillons cérébraux dérivés de macaques vMCJ ont présenté une période d'incubation (457 ± 18 jpe) allongée de 152 jours par rapport aux souris conventionnelles Swiss (305 ± 19 jpe). En 1989, Kimberlin et Walker avaient déjà observé un allongement de la période d'incubation entre les souris splénectomisées et contrôles (Kimberlin et Walker, 1989). Par ailleurs, les profils lésionnels chez ces souris NSG infectées par la vMCJ se limitent au tronc cérébral et à la moelle épinière (profil

bulbospinal selon [Comoy et al., 2017](#)), contrairement aux souris Swiss. Ces observations suggèrent que les souris NSG sélectionnent des souches myélotropes. Aucune accumulation anormale de PrP n'a été détectée dans la rate des souris immunodéficientes NSG exposées par voie intracérébrale bien que des dépôts anormaux soient retrouvés dans le cerveau de ces souris. Ces données avaient déjà été décrites dans un modèle murin immunodéficient (Rag γ : absence de LB, LT et de cellules NK) exposé par voie intracérébrale à une souche d'ESB ([Rybner-Barnier et al., 2006](#)).

Par voie intraveineuse, les souris NSG exposées aux mêmes souches murines (ESB, 6PB1, et tremblante, C506M3) développent également une EST. Inversement, celles exposées à l'agent de la vMCJ n'ont pas présenté les marqueurs spécifiques d'une maladie à prion. Les données de la littérature soulignent que les souris immunodéficientes sont relativement résistantes aux expositions périphériques ([Kitamoto et al., 1991](#) ; [Fraser et al., 1996](#)), ce qui est cohérent avec le rôle primordial du système lympho-réticulaire dans la pathogénèse des maladies à prions lors de contaminations périphériques, et ce bien avant l'accumulation de PrP anormale dans le cerveau. Toutefois, certaines études mettent en avant la susceptibilité des souris immunodéficientes à une exposition périphérique, en intra-péritonéale, ([Lasmézas et al., 1996](#) ; [Klein et al., 1997](#) ; [Mabbott et al., 2000](#)). L'une des hypothèses pour expliquer cette hétérogénéité reste la dose administrée. Concrètement, lorsque la charge infectieuse est importante il peut survenir une neuroinvasion directe c'est-à-dire une dissémination dans le cerveau indépendamment des organes lymphoïdes ([Prinz et al., 2002](#)). Dans notre étude, plusieurs hypothèses peuvent expliquer la sensibilité des souris NSG aux souches de prions adaptées à la souris : (i) des phénomènes de neuroinvasion directe ou encore (ii) la possibilité que ces souris ne soient pas immunodéficientes. Comme décrit précédemment, cette hypothèse semble peu probable mais ne peut être exclue. Un autre argument invalidant cette hypothèse est l'absence de dépôts anormaux de PrP dans la rate de ces souris (techniques conventionnelles automatisées). Concernant, les souris NSG exposées par voies IV à l'agent de la vMCJ nous pouvons émettre l'hypothèse que cette souche (issue d'un macaque vMCJ) n'est pas adaptée à son hôte et que la neuroinvasion directe n'est pas efficace dans ce cas (phénomène de barrière d'espèce).

Exposition des souris NSG à des homogénats « atypiques »

Suite à l'inoculation par voie IV de plasma ou d'homogénats cérébraux provenant de macaques myélopathiques, des phénotypes atypiques similaires aux phénotypes incomplets décrits chez les souris conventionnelles Swiss ([Comoy et al., 2017](#)) ont été observés chez les souris immunodéficientes (NSG). Toutefois, dans ce modèle immunodéficient, aucune PrP^{res} n'a été détectée, seule une spongiose dans la moelle épinière est observée, ce qui correspond au profil spinal précédemment décrit ([Comoy et al., 2017](#) ; [Rontard et al., 2017](#) en préparation). Ces données reposent sur l'analyse neuropathologique approfondie de toutes les coupes histologiques, colorées en HE et au Luxol, de cerveau et de moelle épinière des souris exposées. L'ensemble du matériel disponible (200/220 organes inclus) a été inclus dans cette étude à l'exception des organes des animaux retrouvés morts ne pouvant être analysés en IHC. En parallèle, la recherche de PrP^{res} a été testée sur l'ensemble des animaux (y compris ceux retrouvés morts et non inclus en IHC) par des techniques biochimiques. Les scores de spongiose ont été réalisés sur neuf niveaux différents de régions cérébrales (tronc cérébral, cervelet, noyau caudé, hippocampe, striatum, cortex supra-septal, cortex supra-thalamique, thalamus, hypothalamus, colliculus supérieur) et trois niveaux médullaires (cérébral, dorsal et lombo-sacré).

Plusieurs cas de figures ont été retrouvés dans les souris immunodéficientes, NSG, exposées :

- Absence de spongiose, de PrP^{res} avec ou sans signe clinique : l'animal est considéré comme sain ;
- Présence de spongiose, absence de PrP^{res} associée ou non à des signes cliniques : l'animal est considéré comme ayant un phénotype atypique ;
- Absence de PrP^{res} et pas d'analyse en IHC disponible (animal retrouvé mort) : l'animal est considéré comme sain mais le développement de phénotype atypique ne peut être exclue et pourrait ainsi augmenter le pourcentage d'animaux présentant des formes atypiques ;
- Présence de spongiose, de PrP^{res} avec signes cliniques : l'animal est considéré comme ayant développé une vMCJ.

Dans notre étude, les souris exposées présentant des signes cliniques (tremblements, affaiblissement et troubles moteurs) sans PrP^{res} ni spongiose ont été considérées comme négatives. L'une des hypothèses est la présence de pathologie (exemple : processus tumoral) non liée à une maladie à prion et non identifiée à ce jour.

L'utilisation du caractère spongieux du SNC pour poser le diagnostic des maladies à prions présente une limite majeure car elle repose uniquement sur l'appréciation d'une seule des caractéristiques des maladies à prions. Pourtant, cette analyse neuropathologique est un marqueur puissant puisqu'elle est réalisée d'une part en aveugle et en routine au sein du laboratoire depuis de nombreuses années et d'autre part confirmée comme robuste et pertinente dans le cadre de diagnostic *post-mortem* chez l'Homme.

La spongiose peut être retrouvée, selon les modèles d'étude, dans des souris saines notamment lors des phénomènes de sénescence. Ils ont notamment été décrits chez les souris PrP⁰ comme une conséquence de la déplétion de la PrP^C (Gasperini et Legname, 2014). Par définition, une souris mature (animal complètement développé) n'est pas sensée présenter des phénomènes cérébraux de sénescence telle que la spongiose (Groschup et Buschmann, 2008 ; Wadsworth, Asante, et Collinge, 2010). Cet éventuel biais a été pris en compte dans notre étude en incluant l'ensemble des souris contrôles (non exposées ou inoculées avec un homogénat sain) et en excluant de façon systématique les souris âgées de plus de 76 semaines (18 mois). De plus, en amont de l'analyse, nous avons défini le score de spongiose de 0,5 comme seuil limite de significativité. Certains individus âgés de plus de 70 semaines, non exposés ou exposés avec des inocula sains, ont présenté une spongiose dite « physiologique » associée au vieillissement d'une valeur de 0,25 (en-dessous de notre seuil de positivité préalablement fixé à 0,5).

Hypothèse de la réplication périphérique : retransmissions secondaires

Comme décrit précédemment, l'exposition des souris conventionnelles, Swiss, par voie intraveineuse à des inocula issus de macaques transfusés vMCJ a conduit pour une partie d'entre elles au développement d'une EST classique et pour la majorité des autres souris à des phénotypes atypiques (Comoy *et al.*, 2017). Contrairement à ces résultats, les souris immunodéficientes, NSG, exposées aux mêmes inocula par voie IV n'ont pas développé de maladie à prions « classique » mais uniquement des phénotypes atypiques (Rontard *et al.*, 2017). De façon similaire, les souris inoculées avec des souches myélopathiques ont également développé des phénotypes atypiques.

La capacité des souches myélopathiques à transmettre des phénotypes atypiques dans un modèle murin immunodéficient, souligne des schémas pathogéniques différents de ceux connus pour l'agent de la vMCJ. Ces différents résultats repris dans la figure ci-dessous soutiennent notre hypothèse d'une réplication possible de certaines souches de prions indépendamment d'un système immunitaire fonctionnel (Figure 45).

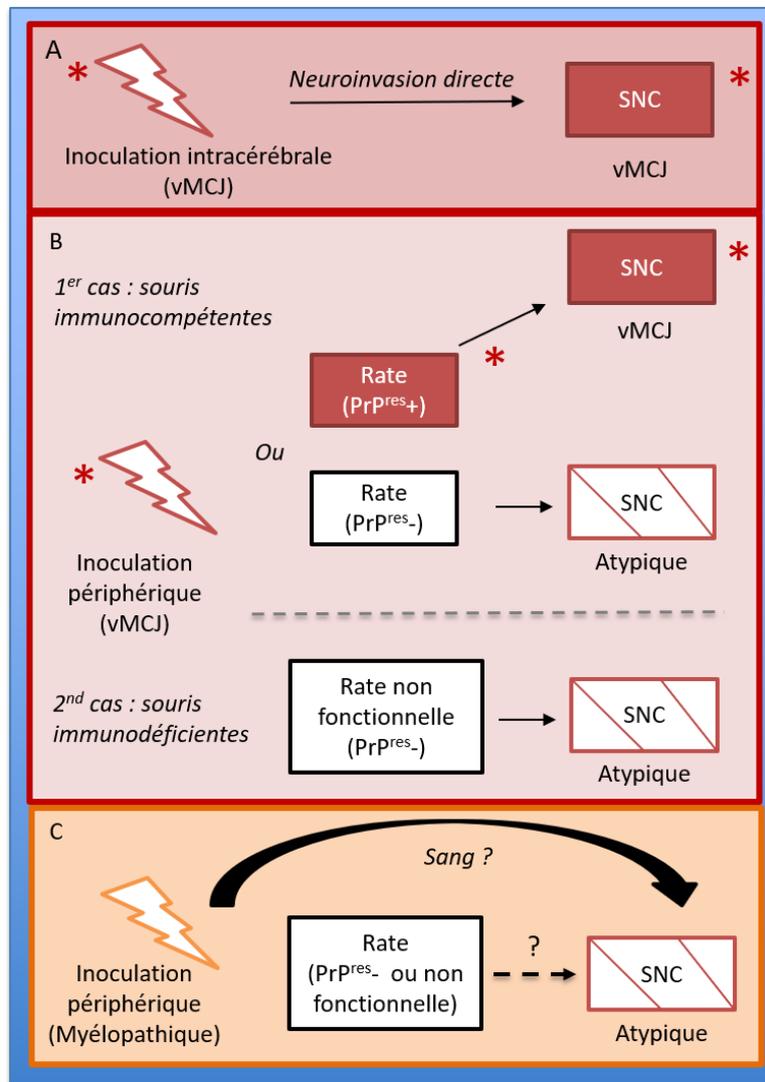


Figure 45 : Hypothèse de la réplication périphérique suite à une exposition par voie intraveineuse.

A) à titre de contrôle, suite à une exposition par voie centrale : réplication directe retrouvée dans les deux modèles murins. B) Suite à une exposition par voie périphérique : neuroinvasion uniquement dans le modèle murin immunocompétent mais présence du phénotype atypique dans les deux modèles murins. C) Suite à une exposition par voie périphérique de souches myélopathiques : phénotype atypique associé à une absence de réplication dans la rate (fonctionnelle ou non).

Dans la perspective de déterminer quel pourrait être le support de la réplication périphérique (s'il existe) lors d'une exposition par voie intraveineuse, nous avons procédé à une série de passages secondaires : exposition d'homogénats spléniques de souris NSG (donneuses) à des souris conventionnelles (modèle Swiss). Actuellement, ces souris sont toujours en cours d'incubation mais plusieurs cas de figures lors de l'analyse *post-mortem* peuvent être envisagés (i) Le premier pourrait être l'apparition d'une maladie à prion avec les marqueurs classiques (PrP^{res}) permettant de souligner une nouvelle fois l'appartenance des souches atypiques au spectre des maladies à prions.

(ii) Le deuxième serait l'apparition de phénotypes atypiques indiquant qu'une réplication périphérique a bien eu lieu dans la rate des souris NSG (lors du premier passage). Les résultats de ces deux premières hypothèses souligneraient des mécanismes communs avec ceux décrits pour l'agent de la vMCJ suite à une exposition périphérique. De façon plus précise, on assisterait donc à la persistance de PrP infectieuse dans la rate, mais qui ne conduirait pas à une réplication périphérique efficace au regard du caractère immunodéficient des souris NSG.

(iii) La dernière possibilité envisagée est l'absence de transmission à la souris Swiss suggérant que la réplication périphérique n'a pas lieu dans la rate. Là encore, nous pouvons émettre l'hypothèse que : la réplication a lieu dans un autre organe (non identifié à ce jour) ou qu'une neuroinvasion directe a eu lieu (dans la moelle épinière). Cette dernière hypothèse doit être nuancée car l'absence de réplication périphérique dans la rate des souris NSG pourrait être liée à leur caractère immunodéficient. Pour répondre à cette question, des transmissions secondaires ont été opérées, en parallèle de mon projet doctoral, à partir de souris Swiss exposées à des souches myélopathiques vers des souris Swiss.

6.2 Étude descriptive des structures spléniques

Une partie des thématiques du laboratoire consiste à mettre au point des techniques d'IHC plus sensibles que celles appliquées en routine. Ces optimisations, en cours de dépôts de brevets, reposent sur la détection des épitopes de la PrP à l'aide de prétraitements particuliers. Nos optimisations nous ont conduit à détecter chez les macaques transfusés développant une myélopathie une accumulation de PrP anormale dans le parenchyme splénique (plus précisément autour des vaisseaux). Ce marquage ectopique est également présent chez les macaques transfusés vMCJ en plus de celui retrouvé dans les structures immunitaires.

De façon générale, les techniques d'histologie ont apporté des éléments importants dans notre étude notamment en termes de localisation de la PrP et d'anatomie des structures considérées. Deux limites méritent toutefois d'être soulevées. La première est que nos résultats sont entièrement basés sur des techniques histologiques. La seconde est que les régions vasculaires sont connues pour « accrocher » de façon non spécifique de nombreux marqueurs. Néanmoins, aucune accumulation anormale de PrP n'est présente chez les macaques sains. De plus, ce marquage a été retrouvé avec plusieurs anticorps anti-PrP.

Caractérisation de la région périvasculaire accumulant anormalement la PrP

Nous avons déterminé que cette région périvasculaire est riche en fibres (déterminé grâce à une coloration à l'orcéine) et en muscles lisses (détectés par l'actine). Les colorations à l'orcéine et à l'hématoxyline-éosine nous ont également permis d'apprécier l'aspect morphologique général de cette structure.

Cette étude a été menée en utilisant des coupes histologiques en série afin de pouvoir comparer les différents marqueurs entre eux. Pour cette analyse, il aurait été plus adapté de réaliser des doubles marquages (PrP^C et SMA ; PrP^C et orcéine). Ces derniers permettraient également de déterminer quelles sont les cellules et structures impliquées dans l'accumulation de la PrP anormale. Cette analyse pourra être complétée par d'autres marqueurs et colorations des fibres de collagène (anticorps anti-collagène IV, colorations au Rouge Sirius ou Trichome de Masson).

À ce jour, peu de données sont disponibles sur les régions périvasculaires spléniques. Dernièrement, une équipe allemande a d'ailleurs découvert une nouvelle population cellulaire chez l'Homme (Steiniger *et al.*, 2014). Leurs travaux soulignent qu'il existerait une troisième population, en plus des cellules dendritiques réticulaires et folliculaires, localisée autour des vaisseaux sanguins et marquée spécifiquement par l'anticorps CD271. Ce marqueur a été retrouvé dans la rate des macaques cynomolgus. Toutefois, il ne marquait pas spécifiquement notre région d'intérêt périvasculaire. L'année suivante, cette même équipe a souligné des différences anatomiques et cellulaires majeures entre l'Homme et la souris (Steiniger, 2015). Ils ont par exemple déterminé que cette population cellulaire CD271 positive est absente chez la souris.

Nos données préliminaires soulignent que les régions périvasculaires accumulant des dépôts anormaux de PrP ne sont pas composées de structures immunitaires comme cela est classiquement connu dans le cadre d'une exposition périphérique. Cette accumulation ectopique pourrait refléter que ces structures sont capables de capter l'infectiosité en fonction de la composition de l'inoculum. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'infectiosité soluble (contenue dans le sang) pourrait être retenue dans les structures périvasculaires, tandis que l'infectiosité présente sous forme d'agrégats ne serait pas retenue et conduirait au développement d'une vMCJ (Comoy *et al.*, 2017). Cette hypothèse est sous-tendue par l'implication d'une hétérogénéité de souches de prions. En effet, il est possible que certaines souches vMCJ soient composées d'un mélange de souches vMCJ « classiques » et myélopathiques. Lors d'une inoculation par voie intraveineuse, les souches myélopathiques pourraient alors « prendre le dessus » et seraient alors majoritaires. Cette hypothèse implique qu'il puisse exister une sélection des souches de prion en fonction de la voie d'inoculation. De façon plus précise, la voie intraveineuse pourrait impliquer des structures vasculaires pouvant jouer le rôle de filtre et retenir l'infectiosité en fonction des différentes formes (soluble ou agrégée).

Ainsi, les structures périvasculaires, décrites dans nos travaux comme accumulant la PrP anormale, pourrait piéger l'infectiosité soluble contenue dans les dérivés sanguins.

Comparaison de rates de différentes espèces

Une autre partie de mon travail a été de déterminer si cette structure périvasculaire existe dans d'autres modèles. À terme, l'objectif était de confirmer ou infirmer si le syndrome myélopathique est spécifique au macaque ou si ces structures pourraient également être impliquées dans d'autres modèles et notamment chez l'Homme.

Notre étude descriptive met en évidence des organisations différentes de la pulpe blanche et rouge dans les modèles expérimentaux étudiés (souris, chèvre, vache, mouton, babouin, macaques, lémurien et humain). Ces disparités anatomiques laissent sous-entendre des différences physiologiques fonctionnelles. Cependant, l'ensemble des espèces étudiées présentent les structures périvasculaires accumulant anormalement la PrP chez les macaques transfusés (vMCJ et myélopathiques). Une analyse plus approfondie est nécessaire afin de comprendre la fonctionnalité de ces structures et étendre ces données en termes d'implication dans la réplication périphérique de l'agent du prion. En perspectives, il faudrait élargir cette étude à d'autres organes lymphoïdes (notamment amygdales et appendices), afin de pouvoir le cas échéant réaliser des études de prévalence *ante mortem* chez l'Homme (c'est un des objectifs du projet ANR « *UnmaskingBloodPrions* »). En effet, les études chez l'Homme sont réalisées à partir de pièces post-opératoires telles que les amygdales et l'appendice.

Néanmoins se pose la question de l'expression physiologique de la PrP^C dans ces différentes structures de la rate. En effet, on peut émettre l'hypothèse qu'en fonction des structures spléniques étudiées (pulpe blanche, rouge), différents niveaux d'expression de la PrP^C soient impliqués dans la réplication de la PrP anormale. Dans ce sens, les travaux de Kim et ses collaborateurs ont déterminé que les souris humanisées (Tg650) ne sont pas le meilleur modèle dans l'étude de la réplication périphérique (Kim *et al.*, 2016). Cet article souligne également l'implication de la PrP^C dans l'organisation anatomique de la rate en comparant différentes lignées murines. Dans cette hypothèse il faudrait analyser et déterminer les modèles présentant des répartitions de la PrP^C proches de celles observées dans les structures spléniques humaines. Ces différences anatomiques et physiologiques pourraient suggérer que l'étude de la réplication périphérique dans les maladies à prions chez la souris n'est pas la plus pertinente pour étudier les mécanismes physiopathologiques humains (Steiniger *et al.*, 2015), et être éventuellement un élément expliquant pourquoi le syndrome myélopathique aurait été mis en évidence chez le macaque cynomolgus et pas précédemment dans d'autres modèles expérimentaux.

Ainsi, nos données sous-tendent notre hypothèse d'une réplication périphérique en dehors des mécanismes connus et que la réplication périphérique précoce conduise soit à une vMCJ soit à des syndromes myélopathiques en fonction de l'inoculation de souches solubles ou agrégées et des structures impliquées (immunitaires versus non immunitaires). Une étude mécanistique est donc nécessaire afin de mieux comprendre ces différences et souligner le risque en termes de santé publique.

Chapitre III : Mise en place d'un modèle organoïde neuroectodermique en 3D d'infection (Étude B)

Le second objectif de mon projet doctoral a été la mise en place d'un modèle cellulaire d'infection alternatif à l'expérimentation animale. Notre stratégie a été d'exposer des mini-brains (MBs) à différentes souches de prions. Ces organoïdes cérébraux initialement mis au point en 2013 consiste en la différenciation de cellules iPS d'origine humaines (Lancaster *et al.*, 2013). Ils récapitulent les différents processus impliqués dans le neurodéveloppement humain et leurs cultures en 3D facilitent les interactions cellule-cellule.

1- Matériel et méthodes de l'étude B

1.1 Les cellules souches pluripotentes utilisées

Dans notre étude, des cellules souches humaines, simiennes et murines ont été utilisées²³.

Les cellules humaines

Les cellules iPS humaines ont été reprogrammées au sein du laboratoire par la plateforme « Ingénierie de la Pluripotence » CEA-SupBiotech (F. Yates et R. Jarray ; Pavoni *et al.*, 2017 : [article en préparation](#)). Elles proviennent de fibroblastes humains BJ (ATCC, France). La reprogrammation a été effectuée grâce au virus de Sendai et à l'expression des quatre facteurs de Yamanaka (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Lieu *et al.*, 2013). Ces cellules ont été cultivées en *feeder-free* sur Matrigel® (Corning®, 354277). Le milieu de culture utilisé est le mTeSR™ (Stem Cell Technologies, 85850) (Thompson et Cohen, 2006). Les cellules iPS ont été sélectionnées manuellement (passage manuel) une fois par semaine ou par traitement chimique à l'aide de ReLeSR (StemCell, 05872). En parallèle, ces cellules ont également été cultivées sur fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inactivés par irradiation (GlobalStem, GSC-6201G) notamment afin de servir de référence lors de l'adaptation du protocole de génération des organoïdes simiens et murins.

Les cellules simiennes

Les cellules iPS simiennes ont été généreusement données par le Docteur Leila Maouche-Chrétien (CEA/DSV/iMETI/STI). Brièvement, ces cellules ont été dérivées de cellules souches hématopoïétiques de macaque cynomolgus (Abed *et al.*, 2015). Elles ont été reprogrammées grâce à la transduction répétée de rétrovirus exprimant les facteurs de Yamanaka (Abed *et al.*, 2015). Ces cellules iPS sont cultivées sur MEFs inactivés par irradiation (GlobalStem).

Le milieu de culture, hES, est composé de DMEM/F12 (Invitrogen), 20% KnockOut Serum Replacement (KOSR, Invitrogen), 100 µM d'acides aminés non essentielles (Invitrogen), 100 µM de β-mercaptol et supplémenté en 10 ng/ml de bFGF (Gibco, PH-G0264). Du FGF stabilisé est également disponible noté StemBeads (StemCultures, SB500) lorsque le milieu de culture ne peut être changé tous les jours.

²³Les différents termes proposés dans cette partie ont été définis précédemment (Pages 79 à 89).

Les cellules murines

Dans notre étude deux types de cellules souches pluripotentes murines ont été utilisées.

Tout d'abord, des cellules souches embryonnaires (cellules ES) généreusement fournies par le Docteur Leila Maouche Chrétien (CEA/DSV/iMETI/STI). Brièvement, ces cellules ont été isolées à partir de la masse interne du blastocyste d'un embryon de souris conventionnelle, C57Bl/6. Elles seront appelées cellules ES C57 dans la suite du manuscrit.

Le second type cellulaire correspond à des cellules iPS obtenues par reprogrammation de fibroblastes murins extraits de souris Tg338 (sur-exprimant la PrP^c ovine et sans expression endogène) (Vilette *et al.*, 2001). Ces cellules, reprogrammées au sein du laboratoire, seront notées iPS 338 dans la suite du manuscrit.

Les deux types de cellules souches pluripotentes murines ont été cultivées sur MEFs inactivées (GlobalStem, GSC-6201G) dans un milieu de culture composé de DMEM (Invitrogen), 10% sérum de vœu fœtal, SVF, 1% de pénicilline/ streptomycine (Sigma, G1146) supplémenté en 10 ng/ mL de LIF (ESGRO-LIF, Millipore). Elles ont été passées manuellement une fois par semaine. Des passages enzymatiques grâce à l'action de la trypsine ont également été réalisés.

1.2 Techniques de culture des cellules souches pluripotentes

Afin de maintenir les cellules souches pluripotentes dans leur état indifférencié, les méthodes de culture sont distinctes de celles couramment utilisées pour les autres types cellulaires. Il est important de déterminer le choix du support, en adhérence (*feeder*) ou non (*feeder-free*), ainsi que la technique de sélection, manuelle ou enzymatique. Ces différents éléments seront repris dans le tableau 22.

Culture sur support nourricier/ en feeder

La culture sur support a été réalisée pour les trois types cellulaires (humains, simiens et murins).

Les MEFs inactivés par irradiation (GlobalStem, GSC-6201G) ont été passés toutes les semaines à raison de 250 000 cellules pour un puits de plaque 6 puits coatés en gélatine (Sigma, G1393). Le puits a préalablement été recouvert d'une solution de gélatine à 0,1% p/v (filtrée à 0,2 µm) et la solution de *coating* incubée pendant vingt minutes à température ambiante. Une fois rincée en PBS, la plaque est prête à être utilisée ou peut être conservée à 4°C en PBS.

Les MEFs sontensemencés dans le puits pré-coaté et maintenus dans du DMEM, 10% SVF et 1% P/S). Le lendemain, les MEFs sont adaptés à leur futur milieu en remplaçant complètement ce dernier par le milieu de culture associé aux cellules souches utilisées. Le surlendemain, les cellules souches pluripotentes peuvent être passées sur les MEFs.

Culture sans support nourricier/ en feeder-free

Cette technique de culture a uniquement été utilisée pour les cellules iPS d'origine humaines.

La culture sans support est possible grâce à l'utilisation d'un *coating* en Matrigel (Corning, 354277). Brièvement, la surface de culture est recouverte d'une solution de Matrigel diluée dans du DMEM/ F12 (Invitrogen) et incubée pendant deux heures à température ambiante. La dilution effectuée est dépendante de la concentration protéique contenue dans le lot, généralement de l'ordre de 13 µL/ ml. La solution de *coating* est ensuite retirée et la boîte peut être directement utilisée en ajoutant du milieu de culture approprié pour les cellules iPS humaines.

Passage manuel

Les cellules souches pluripotentes cultivées en *feeder-free* ou sur MEFs (*feeder*) peuvent être passées manuellement ou par dissociation enzymatique ou chimique.

Le passage manuel consiste à sélectionner sous microscope et sous hotte à flux laminaire de type II, les colonies répondant aux critères morphologiques des cellules iPS. Ces dernières ont été coupées en morceaux à l'aide d'une pipette en verre biseautée (VitroLife) ou grâce à un cône de 20 µL. Les morceaux de colonies ainsi aspirés ont été placés, en milieu de culture adapté, dans une nouvelle boîte de culture coatée en Matrigel ou sur un tapis de MEFs contenant le milieu de culture approprié aux cellules utilisées.

Passage enzymatique ou dissociation chimique

Cette étape varie en fonction du support utilisé et du type cellulaire.

Les cellules iPS humaines peuvent être dissociées chimiquement grâce au ReLeSR (StemCell, 05872). La solution de ReLeSR a été incubée une minute à température ambiante avant d'être entièrement retirée. Les cellules ont ensuite été laissées à l'air libre, sous hotte, pendant cinq minutes avant d'être récupérées dans du milieu de culture. Puis, les cellules ont été diluées dans du milieu de culture et placées dans une nouvelle boîte de culture.

Concernant les cellules iPS humaines et simiennes cultivées sur MEFs, une fois les cellules rincées en PBS, elles ont été incubées de 20 à 40 minutes en dispase (StemCell Technologies, 07923). Lorsque les cellules sont décollées, elles ont été diluées et placées dans une nouvelle boîte. À cette étape, il est important de ne pas faire plus de trois allers-retours avec la pipette afin de maintenir les cellules iPS en colonies.

Les cellules souches pluripotentes murines peuvent être dissociées grâce à la trypsine (Eurobio) incubée pendant 2 minutes à 37°C. L'action de la trypsine a ensuite été arrêtée avec le sérum contenu dans le milieu de culture des cellules souches murines (DMEM ; SVF ; P/S ; LIF).

Congélation des cellules iPS

Les trois types de cellules souches pluripotentes ont été régulièrement congelées afin de maintenir un stock à différents passages.

Une fois les cellules rincées en PBS, elles ont été incubées pendant 15 minutes en collagénase IV (StemCell Technologies, 07909 à 1 mg/mL, pour les cellules *feeder-free*) ou pendant 30 minutes en dispase (pour les cellules cultivées sur MEFs). Lorsque la solution enzymatique est retirée, du milieu de culture a été ajouté et les cellules ont été décollées à l'aide d'un « *scraper* » (grattoir de cellule, Dutscher). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 270 g pendant cinq minutes. Le culot cellulaire a été repris dans une solution composée de 90% de KOSR (Gibco, 10828-010) et 10% de DMSO. Le point crucial est de faire le moins d'aller-retour avec la pipette pour assurer une taille optimale des colonies. Les ampoules contenant les cellules à congeler ont ensuite été placées à -80°C puis conservées dans l'azote liquide.

Tableau 22 : Principales conditions de culture des trois lignées de cellules souches pluripotentes utilisées.

	iPS humaines	iPS simiennes	Cellules souches murines (ES C57 et IPS 338)
Milieux de culture (composition)	mTeSR™ / hES (DMEM/F12 – 20% KOSR - 100 µM NEAA, 100 µM de β-mercaptoéthanol et supplémenté avec 10 ng/ml de bFGF)	Milieu hES supplémenté en FGF	Milieu classique (DMEM, 10% SVF, 1% P/S) supplémenté en LIF (10 ng/ml)
Facteurs stabilisés (pour les jours d'absence)	FGF stabilisé (StemBeads, StemCulture)	FGF stabilisé	Non disponible (Ajout d'un volume de milieu de culture plus important)
Support (feeder-free/ MEF)	Les deux supports : préférence pour <i>feeder-free</i>	MEF	MEF
Passage (manuel/ enzymatique)	Les deux supports : préférence pour passage manuel	Manuel	Manuel

ES : embryonic stem -cells/ FGF : fibroblast growth factor/ iPS : induced pluripotente stem -cells/ KOSR : KnockOut Serum Replacement/ LIF : leukemia inhibitory factor/ MEF : murine embryonic fibroblast/ NEAA : acide aminé non essential/ P/S : pénicilline-streptomycine

1.3 Reprogrammation des cellules murines

Les cellules iPS 338 ont été reprogrammées au sein du laboratoire grâce au virus de Sendai. Le protocole comprend différentes étapes : isolement et amplification des cellules murines adultes, transduction au moyen du virus de Sendai et caractérisation des cellules reprogrammées (Figure 46).

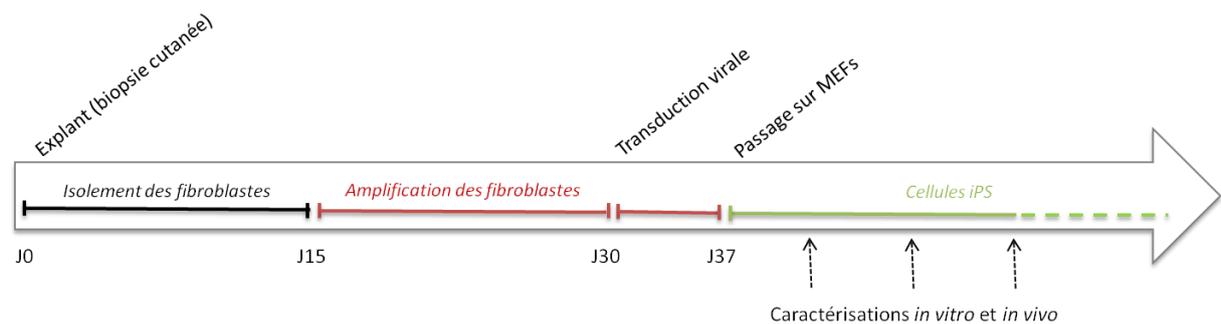


Figure 46 : Schématisation du mode opératoire d'obtention de cellules souches pluripotentes induites murines. IPS : induced pluripotent stem – cells. MEF : murine embryonic fibroblasts.

Isolement des fibroblastes murins

Ce protocole a été réalisé sur des souris conventionnelles (C57Bl/6), transgéniques (Tg338) et KO pour le gène *Prnp* (*Zurich1*).

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

Une fois l'animal euthanasié (souris âgée de 4 à 6 semaines) par injection intra-péritonéale de pentobarbital, une biopsie de peau d'environ 2 cm² a été réalisée. Pour cela, la zone d'intérêt est tonduée et désinfectée à l'éthanol 70%. Le tissu prélevé a ensuite été placé dans une solution de Bétadine à 0,5%.

L'ensemble des étapes décrites ci-dessous a été réalisé sous hotte afin de garantir un environnement stérile. Une fois le tissu rincé deux fois en PBS, un traitement enzymatique à la collagénase IV (StemCell Technologies, 07909 à 1 mg/mL) a été réalisé pendant 30 min à 37°C. L'explant a ensuite été rincé deux fois en PBS et coupé en plusieurs morceaux (environ 0,5 cm²). Les morceaux ainsi réalisés ont été placés dans une boîte de culture en s'assurant que le derme soit dirigé vers le fond de la boîte afin de faciliter l'adhésion et la croissance des fibroblastes. Les explants ont été laissés à l'air libre, sous hotte, pendant 10 minutes minimum afin de permettre l'évaporation du surplus de liquide. Une goutte de SVF (correspondant à environ 200 µL) supplémenté en antibiotiques (5% de pénicilline/streptomycine, Sigma, G1146) a été ajoutée directement sur les morceaux d'explant. Ils seront incubés pendant 24 h à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Lorsque les explants ont adhéré sur le fond de la boîte de culture (environ deux jours après la mise en culture), du milieu a été ajouté en volume suffisant afin de recouvrir l'ensemble de l'explant (2 mL pour une boîte de 35 mm). Le milieu de culture composé de DMEM (Gibco), 10% de SVF (ThermoFisher) et 5% de P/S (Sigma, G1146) a été changé tous les trois jours.

Environ 15 jours après la mise en culture, un tapis de fibroblastes est observé autour de l'explant. Ce dernier doit alors être retiré car il devient un frein à la croissance des fibroblastes. Pour cela, la plaque a été rincée deux fois en PBS et l'explant retiré à l'aide de cônes stériles. Les cellules ont ensuite été dissociées à la trypsine (Eurobio, CEZTDA00) afin de récupérer les fibroblastes. L'action de la trypsine a été arrêtée avec un volume équivalent de milieu de culture contenant du sérum. Une étape de centrifugation a ensuite été réalisée pendant 5 minutes à 1200 rpm. Une fois le surnageant retiré, le culot cellulaire a été repris dans du milieu de culture. Une partie des cellules a été amplifiée en vue de réaliser une reprogrammation. Une autre partie a été congelée dans 90% de SVF et 10% DMSO puis conservée à -80°C pendant 24 heures avant d'être placée dans l'azote liquide.

Isolement des cellules de la moelle osseuse de différentes espèces murines

En parallèle, les cellules de la moelle osseuse ont été récupérées en vue de réaliser des reprogrammations grâce au virus de Sendai. Concrètement, trois espèces murines ont été utilisées, des souris : conventionnelles (C57Bl/6), transgéniques (Tg338) et délétées pour le gène *Prnp* (ZH1).

De façon plus précise, une fois l'animal euthanasié, les deux fémurs ont été récupérés et coupés aux extrémités. L'objectif va être d'appliquer une pression à une des deux extrémités à l'aide d'une seringue contenant du milieu de culture stérile. Les cellules de la moelle osseuse sont alors récupérées à l'autre extrémité dans un tube stérile. Une fois centrifugées à 270 g pendant 5 minutes, les cellules ont directement été placées dans une boîte de culture. Le milieu de culture, composé de DMEM, 10% SVF et 5% P/S, a été changé tous les trois jours. Les antibiotiques ont été maintenus pendant une semaine puis retirés du milieu de culture. Au bout d'environ 10 jours, les cellules ont été décollées de leur support grâce à l'incubation pendant cinq minutes à 37°C de la trypsine. L'action de cette dernière a été arrêtée par l'ajout de milieu de culture contenant du sérum. Une partie des cellules a préalablement été diluée avant d'être remise en culture.

Reprogrammation des fibroblastes murins

Seuls les fibroblastes issus des souris Tg338 ont finalement été reprogrammés grâce au virus de Sendai (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Thermofisher) exprimant les quatre facteurs de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc). Les cellules ont étéensemencées la veille dans des puits de plaques 24 puits à raison de 40 000 cellules/ puits de manière à obtenir une confluence de 60% le jour de la transduction.

Le lendemain, la transduction a été réalisée pendant 24 heures à 37°C en doublant les ratios de vecteurs proposés par le fabricant (Tableau 23). Les antibiotiques (P/S) ont été retirés du milieu de culture pour limiter toute interférence avec le virus.

Tableau 23 : Ratio des différents vecteurs préconisé par le fabricant lors de la transduction par le virus de Sendai (Thermofisher, Kit CytoTune Sendai).

Référence (CytoTune Sendai)	KOS : Klf4 – Oct3/4 – Sox2	c-Myc	Klf4
Multiplicity of infection (MOI)	5	5	3

En parallèle, un autre puits contenant le même nombre de fibroblastes murins a été exposé au virus GFP (*Green fluorescent protein*, CytoTune Thermofisher, A16519) à titre de contrôle du bon déroulement de l'infection. Ce vecteur codant pour la protéine fluorescente (GFP) permet de vérifier en amont que les fibroblastes pourraient être sensibles à la transduction par le virus de Sendai.

Deux jours après, le milieu de culture a été complètement changé. Au bout de six jours, les cellules sont décollées (digestion enzymatique à la trypsine) et passées sur des MEFs inactivés (GlobalStem, GSC-6201G). C'est à ce stade que le facteur de croissance, LIF, a été ajouté (ESGRO-LIF, Millipore, ESG1106). Concrètement, le milieu des cellules murines (iPS 338 et ES C57) est constitué de DMEM, 10% SVF, 1% P/S et 10 ng/ mL de LIF. Au cours de la culture, des colonies de cellules iPS vont se former et seront sélectionnées manuellement chaque semaine.

Caractérisation de la pluripotence des cellules iPS 338

Plusieurs expériences ont été réalisées afin de mettre en évidence le caractère pluripotent des cellules iPS 338 reprogrammées au sein du laboratoire. La première d'entre elles a été d'observer l'aspect des colonies en culture. Les colonies non différenciées et présentant des bords lisses ont été sélectionnées manuellement à chaque passage afin de les maintenir en culture. Le deuxième critère a été de générer des corps embryoides (EBs) grâce à la technique présentée ci-dessous²⁴.

Des tératomes ont également été réalisés en injectant, *in vivo*, 200 µl de lysat cellulaire dilués de moitié dans du Matrigel® (Corning®, 354248). Pour cette expérience, des souris immunodéficientes, NSG, âgées de moins de 10 semaines ont été utilisées. Brièvement, une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire a été repris dans 100 µl de PBS et dans le même volume de Matrigel® préalablement décongelé pendant 12 heures à 4°C. À l'aide d'une seringue à insuline, la solution cellulaire (lysate cellulaire dilué en Matrigel®) a été injectée délicatement en sous-cutanée au niveau du flanc de l'animal préalablement anesthésié, tondu et désinfecté sur la zone d'intérêt. Jusqu'à son réveil complet, l'animal est surveillé et placé sous lampe chauffante. Environ un mois et demi après, la tumeur est visible.

²⁴ Paragraphe : 1.4 Génération des organoïdes neuro-ectodermiques

Avant que l'animal présente des signes de douleur (notamment des difficultés à se déplacer), il est euthanasié par un surdosage de pentobarbital. La tumeur est alors prélevée et fixée en formol. Les coupes ont ensuite été colorées en HE afin de vérifier la différenciation des cellules reprogrammées dans les trois feuillettes (endoderme, mésoderme et ectoderme).

La recherche de marqueurs de pluripotence a été effectuée par PCR. L'ARN total a été isolé des cellules iPS grâce au kit NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. Au total 1 µg d'ARN a été utilisé pour réaliser la transcriptase inverse afin de synthétiser de l'ADN complémentaire (BioRad, iScript cDNA Synthesis Kit). La PCR a été réalisée via le kit GoTaq DNA Polymerase (Promega). Les produits de PCR ont été déposés et électrophorés sur gel d'agarose à 1% et analysés grâce au Gel Doc 2000 System (Biorad). Les amorces, présentées dans le tableau 24, ont été utilisées à une concentration de 50 µM (Eurofins).

Tableau 24 : Liste des oligonucléotides utilisés dans la caractérisation des cellules souches murines par PCR.

Nom des oligonucléotides	Séquence (5'->3')	Température moyenne
Oct3/4 sens	TCTTCCACCAGGCCCGGCTC	69,6
Oct3/4 anti-sens	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	69,6
Sox2 sens	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	64,2
Sox 2 anti-sens	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	57,1
Rex1 sens	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTGGGA	62,7
Rex1 anti-sens	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT	64,4
Nanog sens	CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC	59,4
Nanog anti-sens	CGGTTCATCATGGTACAGTC	57,3

1.4 Génération des organoïdes neuro-ectodermiques

Génération des organoïdes issus de cellules souches pluripotentes humaines

La génération des MBs a été adaptée au laboratoire d'après le protocole de Lancaster et ses collaborateurs (Lancaster *et al.*, 2013 ; Lancaster et Knoblich., 2014). Des corps embryoides (EBs) ont été effectués en utilisant la technique de la goutte pendante (encore appelée goutte suspendue ou *Hanging drop*) forçant l'agrégation cellulaire (Figure 48).

Les cellules iPS sont préalablement isolées à l'aide d'une digestion enzymatique (Accutase, Sigma, A6964). Puis, un nombre défini de cellules iPS a été déposé directement sous forme de goutte dans le couvercle d'une boîte de Pétri (60 mm). Ce couvercle est ensuite retourné, et 15 mL de PBS ont été placés dans le fond de la boîte afin de maintenir un environnement humide. Les cellules en suspension ont ensuite été incubées deux jours à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂. Le nombre de cellules, la taille de la goutte et le temps d'incubation ont fait l'objet d'études au laboratoire dans le cadre de la mise au point de ce protocole.

Au bout de deux jours, les gouttes contenant les cellules agrégées sont récupérées délicatement à l'aide d'une pipette (P1000) et d'un cône préalablement coupé pour ne pas endommager les sphéroïdes (Figure 47C). Les EBs ont été placés dans des plaques non traitées (Corning, 351146). Pour certaines expériences, des plaques préalablement *coatées* en poly-héma ont été utilisées afin de limiter l'adhésion cellulaire tout en forçant le maintien en 3D des EBs. Le fond du puits a été recouvert durant 12 heures d'une solution de polyHEMA (Sigma, P3932) : pour 38 ml d'éthanol absolu, 2 ml d'eau distillée et 1,2g de polyHEMA. Le lendemain les plaques peuvent être directement utilisées ou conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

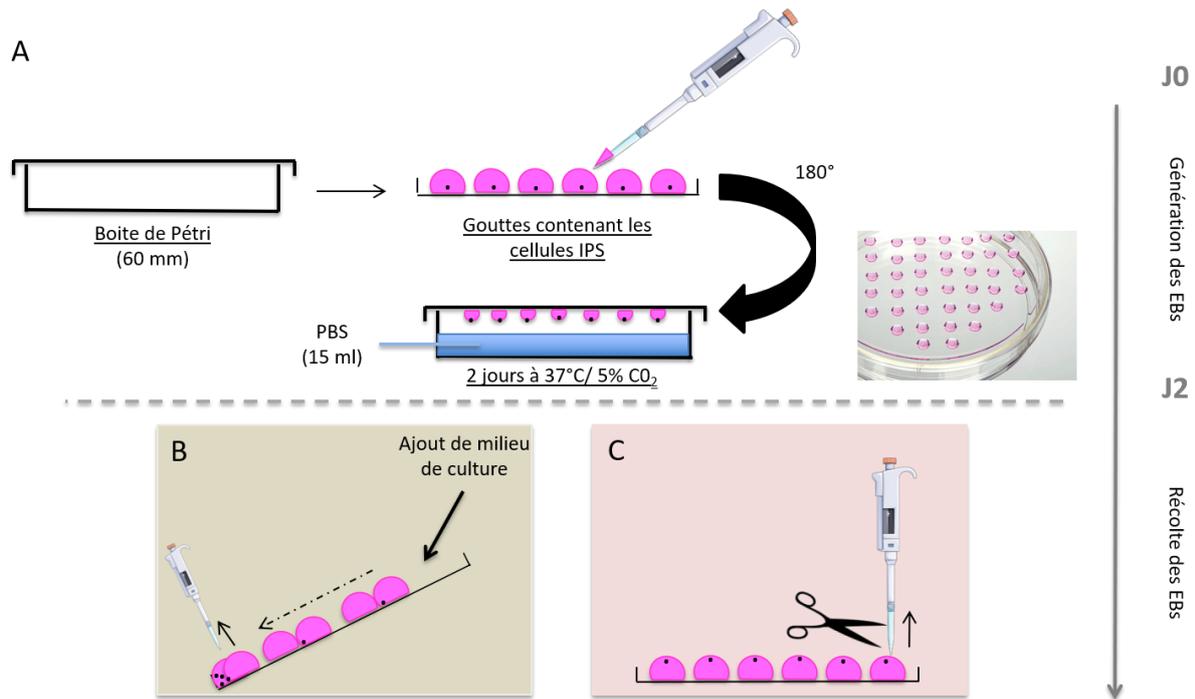


Figure 47 : Mode opératoire de génération des corps embryoides grâce à la technique de la goutte pendante.

A) La technique de génération des corps embryoides (EBs) grâce à la technique de la goutte pendante (*Hanging drop*) nécessite de déposer 9000 cellules souches pluripotentes induites (iPS) préalablement isolées dans un volume optimisé de milieu de culture. Les gouttes contenant les cellules sont ensuite placées sur le couvercle d'une boîte de Pétri, puis ce dernier est retourné et maintenu à 37°C pendant deux jours. B - C) Au bout de deux jours les EBs sont récoltés selon deux méthodes. B) La première méthode consiste à déposer du milieu de culture sur le haut du couvercle, légèrement incliné, afin de faire sédimenter les EBs dans le bas permettant ainsi de pouvoir les récupérer. C) La seconde technique consiste à récupérer les EBs directement à l'aide d'un cône de 100 µL préalablement coupé.

La suite du protocole est équivalente à celui développé par Lancaster et son équipe (Lancaster *et al.*, 2013 ; Lancaster et Knoblich., 2014). Brièvement, le milieu de culture des EBs a été changé au minimum tous les deux jours. En parallèle, les EBs ont été observés quotidiennement sous microscope afin d'enlever ceux ne possédant pas les caractéristiques morphologiques requises (fusion, désagrégation, taille inférieure à 200 µm). Puis, les EBs ont été passés dans différents milieux de culture pour induire la différenciation neurale (Figure 48).

Environ 10 jours après, les EBs ont été encapsulés dans du Matrigel® à haute concentration (BD Matrigel Matrix High Concentration, 354248, Corning Matrigel Matrix) servant de support pour maintenir leur croissance en 3D. Sur une surface de Parafilm, les EBs ont été placés dans une goutte de 30 µL de Matrigel®. Ce dernier doit être rapidement prélevé à l'aide de cônes mis préalablement à -20°C. Le film de paraffine contenant les EBs entourés de Matrigel® sont placés à 37°C pendant 10 minutes. Cette étape permet au Matrigel® de polymériser et ainsi d'encapsuler les EBs. Les EBs encapsulés en Matrigel® seront ensuite remis en culture. Au bout de cinq jours, les plaques de culture contenant les MBs ont été mises sous agitation permanente afin d'assurer l'oxygénation et l'apport des différents nutriments au cœur des sphéroïdes.

Lorsque les EBs sont encapsulés dans le Matrigel®, ils sont appelés mini-brains (MBs) selon le terme employé par Lancaster et son équipe (Lancaster *et al.*, 2013).

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

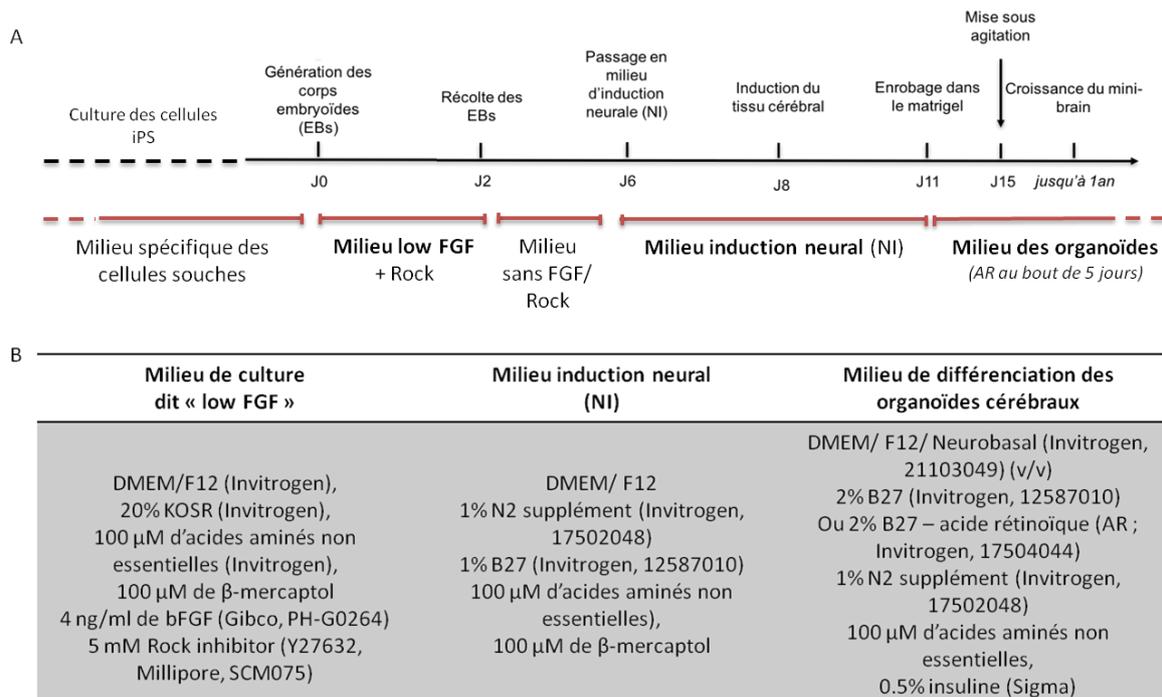


Figure 48 : Liste des milieux de culture utilisés dans la génération des organoïdes neuro-ectodermiques en fonction du stade de différenciation.

Génération d'organoïdes cérébraux murins et simiens

Le même protocole de génération des MBs humains a été utilisé avec la technique de la goutte pendante. La seule modification réside dans les étapes initiales de séparation des cellules souches pluripotentes des MEFs. Les cellules ont été rincées deux fois en PBS, puis incubées de 20 à 40 minutes en dispase (StemCell Technologies, 07923). Lorsque les cellules sont décollées, elles ont été placées dans un tube de 15 ml afin de séparer les MEFs des cellules iPS d'intérêt. Une fois les cellules sédimentées, le surnageant contenant les MEFs a été retiré et du milieu de culture a été ajouté afin de répéter cette étape de sédimentation. Une fois le surnageant enlevé, les colonies ont été dissociées en cellules isolées. Le culot cellulaire a été repris dans de la trypsine (Eurobio, CEZTDA00) en réalisant plusieurs allers-retours avec une P1000. La dissociation se poursuit en plaçant les cellules dans la trypsine pendant deux minutes à 37°C. L'action de la trypsine a été arrêtée avec un inhibiteur de trypsine (Lonzo TNS, CC-5002). La suite du protocole est ensuite identique et les EBs sont générés grâce à la technique de la goutte suspendue.

Afin de distinguer ces structures obtenues à partir de cellules souches murines et simiennes, des MBs issues de cellules iPS humaines, elles seront appelées organoïdes dans la suite du manuscrit.

1.5 Techniques de colorations

Caractérisation immunohistochimique des organoïdes

Contrairement au protocole de Lancaster et son équipe, les caractérisations des organoïdes neuro-ectodermiques ont été réalisées par IHC et non par immunofluorescence pour des raisons de commodités au sein du laboratoire. En pratique, une fois ces structures fixées dans une solution de formol 4% (VWR, MC3136136010) pendant deux jours à 4°C, ces dernières ont été rincées trois fois en PBS puis maintenues jusqu'à inclusion en paraffine dans du PBS à 4°C. Notre première stratégie a été d'enrober ces organoïdes fixés dans une solution de collagène afin de ne pas endommager leur structure 3D.

Puis, différentes optimisations, réalisées au sein de l'équipe, ont permis de négliger cette étape, notamment en réduisant le temps d'inclusion de 8 heures à 5 heures, et d'inclure les organoïdes directement en paraffine. Le protocole d'inclusion en paraffine est présenté dans le tableau 25 réalisé grâce à la machine sous-vide Shandon Excelsior (Thermo Electron Corporation). Les immunomarquages ont été réalisés à l'aide du protocole présenté précédemment²⁵ grâce aux anticorps répertoriés dans le tableau 26.

Tableau 25 : Programme d'inclusion optimisé pour les organoïdes cérébraux.

Solutions	Temps
Alcool 70%	20 minutes
Alcool 96%	15 minutes
Alcool 96%	20 minutes
Alcool 100%	30 minutes
Alcool 100%	30 minutes
Alcool 100%	30 minutes
Xylène	15 minutes
Xylène	15 minutes
Xylène	20 minutes
Paraffine (58°C)	30 minutes
Paraffine (58°C)	30 minutes
Paraffine (58°C)	30 minutes

Tableau 26 : Liste des anticorps utilisés pour caractériser les mini-brains.

Anticorps	Références	Dilutions
Pax6 (lapin)	Covance, PRB-278P	1/300
Sox2	Chemicon, AB5603,	1/300
Fzd9	Frizzled-9 ; Acris, SP4153P	1/200
Nestine	eBioscience, 14-9843	1/500
Neurofilament	Covance, SMI-310R,	1/200
NCam	Abcam (AB9018)	1/1000
NeuN	Abcam, AB104225	1/1000
Vimentine	Dako, z0458	1/2000
MAP2	Abcam, AB32454	1/1000
Tuj1	R&D Systems (MAB1195)	1/1000
GFAP	Abcam (ab7260)	1/4000
Iba1	Wako, ynl3901	1/2000
Ki67 (lapin)	Abcam (15580)	1/1000
Sha31 (souris)	Spibio (A03213)	1/5000

Détection des cellules apoptotiques grâce au « TUNEL »

Le principe de la technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*) repose sur la détection de la dégradation de l'ADN dans les cellules en apoptose. Ce dernier subit un clivage par des nucléases conduisant à des extrémités 3'OH libres. Le Kit TUNEL (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein 11684795910) dispose de transférase (notée enzyme) capable en présence d'extrémité libre d'ajouter des dUTP couplés à la fluorescéine (appelé marqueur).

²⁵ Page 117

Les coupes histologiques ont tout d'abord été déparaffinées. Un pré-traitement a ensuite été réalisé sur les coupes en les incubant pendant 15 minutes à température ambiante avec une solution de PK à 20 µg/ mg dilué en 10 mM de Tris pH = 7,5 et 5 mM d'EDTA. Les lames ont été lavées deux fois cinq minutes en PBS. Une incubation d'une heure à 37°C a été réalisée en présence de l'enzyme dans une atmosphère humide et à l'abri de la lumière (20 µL d'enzyme et 180 µL de marqueur). Une fois rincées plusieurs fois en PBS, les lames ont été montées dans du milieu Vectashield contenant du DAPI (Milieu de montage Vectorlabs). En microscopie à épifluorescence, il a été possible de distinguer les cellules ayant intégrées la fluorescéine marquée en vert et les noyaux en bleu.

L'analyse du pourcentage de cellules a été réalisée grâce au logiciel ImageJ. Pour cela, le ratio des cellules positives (c'est-à-dire ayant intégré la fluorescéine) sur les cellules totales (bleu, DAPI) a été réalisé.

1.6 Exposition chronique des organoïdes cérébraux humains

Deux stratégies d'exposition des organoïdes ont été testées (Figure 49) :

- Une stratégie dite « chronique » pour les MBs humains ;
- Une stratégie dite « aiguë » pour les organoïdes humains, murins (ES C57 et iPS 338) et simiens.

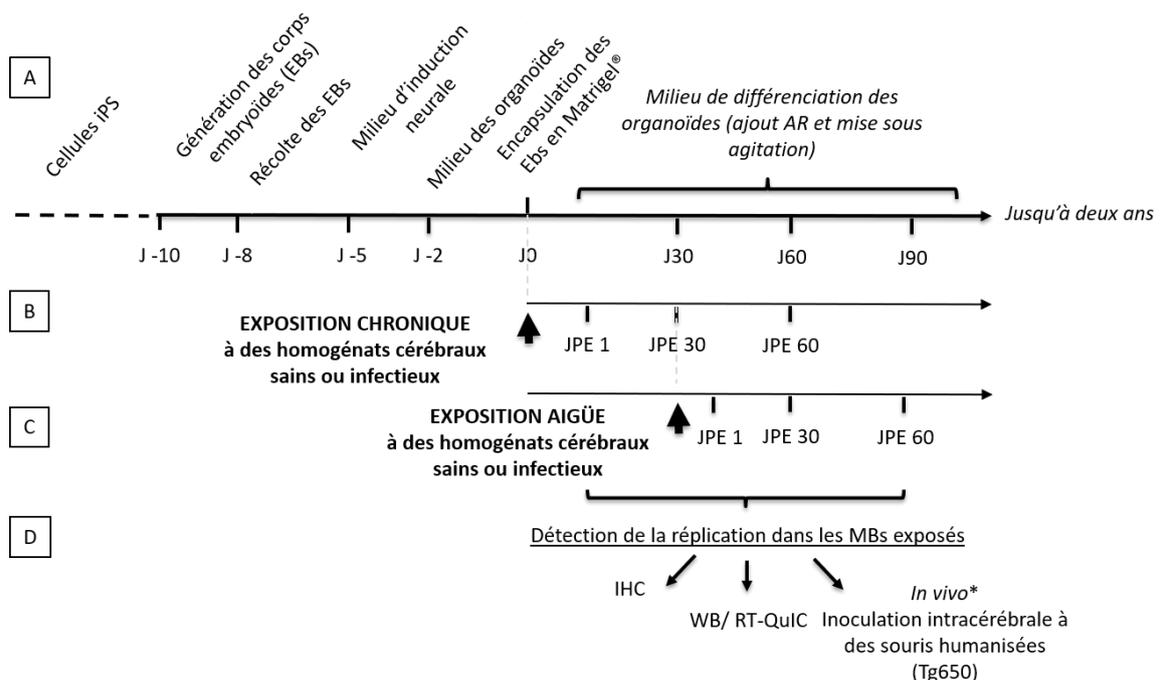


Figure 49 : Stratégies d'exposition des organoïdes neuro-ectodermiques.

A) Protocole de génération des mini-brains (MBs) humains d'après Lancaster et son équipe (Lancaster *et al.*, 2013). Ils ont été générés à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS) humaines. Les corps embryoides (EBs) ont été passés dans différents milieux de culture afin d'induire leur différenciation vers le lignage neuro-ectodermique puis ils ont été enrobés en Matrigel® (Corning). B) Exposition chronique des MBs humains. Cette stratégie d'exposition a consisté à mettre en contact les MBs humains avec des homogénats cérébraux directement dans le Matrigel®. Les homogénats proviennent de macaques contrôles (sains) ou infectieux (exposé à un isolat de vMCJ ou sMCJ). C) Exposition aiguë des organoïdes (humains, murins et simiens) directement dans le milieu de culture. L'exposition a été réalisée lorsque les organoïdes avaient été encapsulés en Matrigel® depuis minimum 30 jours. D) Les organoïdes ainsi exposés ont ensuite été récupérés différents jours post-exposition (JPE) : 1, 30 et 60. La réplication anormale de protéine prion dans les MBs exposés a ensuite été analysée par immunohistochimie (IHC), biochimie (Western blot, WB) et *in vitro* (QuIC). L'infectiosité potentielle contenue dans les MBs humains exposés de façon chronique a été évalué *in vivo* en inoculant par voie intracérébrale des souris humanisées (Tg650).

Préparation des inocula

Les MBs humains ont été exposés à des souches sporadiques et de variante de la MCJ. Les inocula proviennent tous de cerveaux infectieux de macaques initialement exposés par voie IC. En parallèle, des homogénats provenant de macaques sains ont été utilisés à titre de contrôle négatifs.

Les homogénats cérébraux (20% poids/ volume dans une solution de glucose à 5%) ont été clarifiés. Pour cela, ils ont été soniqués (12 cycles de sonication de 10 secondes – 1 minute de pause dans de la glace) et centrifugés (1500 g pendant 10 minutes). Le culot a été solubilisé dans un volume équivalent avec une solution de glucose à 5%. Ces étapes de sonication/ centrifugation ont été répétées deux fois. Les trois surnageants correspondant ont été *poolés* et placés dans un tube *low binding*. Des aliquots (50 µl) ont été conservés à -80°C et décongelés le jour de l'exposition.

Stratégie d'exposition chronique

L'homogénat cérébral clarifié (équivalent à 10% poids/ volume) a été mixé au 1/10 dans du Matrigel® avant d'être encapsulé autour des MBs humains (Figure 49B). Les MBs ainsi exposés ont été remis en culture selon le protocole présenté précédemment. Ils ont ensuite été récoltés aux différents temps post-exposition (J1/ J30/ J60) afin de mettre en évidence une éventuelle réplication anormale de la PrP par IHC, WB et RT-QuIC. L'infectiosité contenue dans ces MBs a été évaluée grâce à des inoculations *in vivo* dans des souris humanisées (Tg650).

1.7 Exposition aiguë des organoïdes neuro-ectodermiques

En parallèle, une seconde stratégie d'exposition a été réalisée pour les organoïdes humains, murins et simiens.

Préparation des inocula

Les inocula proviennent de cerveaux infectieux soit de macaques (pour les souches humaines et simiennes) soit de souris. Ils ont été prélevés en phase symptomatique. En parallèle, des homogénats provenant de macaques et de souris sains ont été utilisés à titre de contrôle négatifs. Les organoïdes humains et simiens ont été exposés à des souches sporadiques et de variante de la MCJ. Les organoïdes murins ont été exposés avec deux souches de tremblante : C506M3 ([Lasmézas et al., 1996](#)) et une seconde issue du mouton (génotype ARQ/ VRQ) adaptée à la souris nommée TAC²⁶.

Stratégie d'exposition aiguë

Cette nouvelle stratégie d'infection a consisté à ajouter directement l'inoculum infectieux couplé à des billes Ademtech d'un diamètre de 300 nm (Ademtech Carboxyl-Adembeads, 0213). Les particules Ademtech ont préalablement été décoâtées par chauffage dans un tampon Laemmli et longuement lavées dans du PBS. L'homogénat 20% a été dilué de moitié dans une solution de PBS et de P/S (v/v). Cette solution a été soniquée à l'aide d'un sonicateur à sonde *cup-horn* (amplitude 20%, 10 fois). Puis, l'homogénat 10% a été dilué à une concentration finale de 1% dans une solution de PBS contenant un volume optimisé de billes décoâtées.

²⁶ La souche de tremblante adaptée, nommée TAC, est issue d'une transmission verticale de tremblante, entre la brebis et son agneau datant de 2002 ([Couquet et al., 2005](#)). Lors de la suspicion de tremblante de cette brebis (confirmée *post-mortem*), elle était gestante. Dès la mise bas, l'agneau a été isolé et nourri à l'aide de lait artificiel afin d'éviter tout risque de contamination horizontale. Environ six mois après l'agneau développera une tremblante avec un temps d'incubation particulièrement raccourci ([Couquet et al., 2005](#)).

Les billes et l'homogénat ont été incubés une heure à 20°C sous agitation (500 rpm) afin de forcer la fixation de l'homogénat sur les billes. Puis, les organoïdes ont été incubés à 37°C dans cette solution (à raison d'un MB dans 200 µL) pendant 2 heures. Les organoïdes ainsi exposés sont ensuite remis en culture sous agitation. Le lendemain, le milieu de culture ainsi que la boîte de culture sont changés afin d'éviter tout risque de maintien de l'infectiosité résiduelle fixée sur le support. Les organoïdes exposés sont ensuite récoltés aux différents temps post-exposition (1/ 30/ 60) afin de détecter l'éventuelle répllication anormale de la PrP par IHC, WB et RT-QuIC.

Détection des ions ferriques grâce à la coloration de Perls

Les billes Ademtech étant métalliques il est possible de réaliser une coloration de Perls afin de mettre en évidence les ions ferriques (Fe³⁺). Une fois les organoïdes exposés inclus en paraffine, des coupes histologiques de 5 µm ont été réalisées. Les coupes déparaffinées ont été placées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution d'acide de ferrocyanure. Cette dernière composée de 2% de ferrocyanure de potassium (20 g de potassium hexacyanoferrate dans 1 L d'eau distillée), 2% d'acide chlorhydrique 2N diluée dans de l'eau distillée, doit être préparée extemporanément et peut être conservée maximum un mois à 4°C. Les lames ont été rincées rapidement à l'eau courante puis deux fois cinq minutes en eau distillée. Une contre-coloration a ensuite été réalisée en rouge nucléaire (Vector Nuclear Fast Red, H3403). Puis, les coupes ont été rincées en eau distillée, déshydratées et montées entre lames et lamelles. La coloration de Perls met en évidence les complexes insolubles contenant du fer en bleu et les noyaux en rose.

1.8 Détection de la répllication anormale dans les organoïdes exposés

Détection des phénomènes d'agrégation dans les organoïdes exposés par RT-QuIC

L'ensemble des expériences réalisées en RT-QuIC sur les structures organoïdes ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Etienne Levavasseur (ICM, Paris) selon le protocole décrit précédemment (Levavasseur *et al.*, 2017). Brièvement, les organoïdes ont été dilués 1000 fois dans une solution composée de : PBS – milieu N2 (Life Technologies) et dodécylsulfate de sodium à 0,1%. Le substrat utilisé est la PrP recombinante de hamster (aa 23-231) diluée dans une solution de NaCl à 400 mM. La réaction d'agrégation contient la thioflavine (10 µM), la PrP recombinante et les échantillons dilués. Les plaques Nunc à fond optique ont été incubées dans la machine BMG Fluostar Omega. La lecture a été effectuée à 45°C pendant 70 heures avec des cycles de une minute sous agitation (600 rpm, gain à 1000) et une minute d'incubation. Chaque organoïde dilué a été testé en triplicat.

Inoculations des organoïdes exposés par voie intracérébrale à des souris

L'ensemble des expériences a été réalisé en accord avec la réglementation européenne relative (Directive EU 2010/63) et approuvé par le comité d'éthique du CEA (CETEA, numéro 16-045). Les MBs humains exposés chroniquement ont été inoculés à des souris humanisées (Tg650, PrP^C humaine MM sur le codon 129) âgées en moyenne de 10 semaines. Les organoïdes murins (MB338 et MBC57) exposés à une souche de tremblante, TAC, ont été inoculés à des souris surexprimant la PrP^C ovine (Tg338, VRQ/ VRQ). Brièvement, les souris anesthésiées (xylazine/ kétamine) ont été inoculées dans le cortex pariétal à raison de 20 µl. Chaque souris a été exposé à 1/15 des organoïdes. Des dilutions limites ont été effectuées en réalisant trois dilutions successives (1X, 1/10, 1/100). Lors de l'apparition des signes cliniques, les souris ont été euthanasiées par surdosage de pentobarbital (180 mg/ Kg) et la présence de PrP^{res} a été recherchée dans le cerveau en ELISA.

Détection de la PrP^{res} cérébrale en ELISA

La purification de la PrP^{res} a été réalisée grâce au kit Bio-Rad en présence de protéinase K (40 µg/ mg de protéine). La détection de la PrP^{res} purifiée à partir du cerveau des souris Tg650 a été effectuée grâce au kit (TeSeE, Bio-Rad) et celle de la PrP^{res} contenue dans les souris Tg338 avec le kit « *Sheep and Goat* » (Bio-Rad).

Analyses statistiques du bioessai

La période de survie des souris inoculées correspond à l'intervalle entre le moment de l'injection et la mort de l'animal suivant le développement de signes cliniques caractéristiques d'une EST confirmée par détection de PrP^{res} en ELISA. La courbe de survie a été réalisée par analyse statistique par Kaplan-Meier. Le titre infectieux a été calculé d'après la méthode de Reed et Muench ([Reed et Muench, 1938](#)).

2- Résultats de l'étude B

2.1 Obtention et caractérisation des organoïdes cérébraux humains non exposés

Les mini-brains (MBs) humains sont obtenus à partir de cellules pluripotentes induites humaines (iPS) qui ont la particularité de pouvoir être cultivées à long terme et de pouvoir se différencier *in vitro* dans tous les types cellulaires. La première étape de ce projet a consisté à adapter la technique de différenciation des cellules iPS en organoïdes, initialement décrite par Lancaster et son équipe (Lancaster *et al.*, 2013), aux contraintes expérimentales particulières de notre étude. Nous avons dû développer une technique permettant de produire un grand nombre de MBs afin d'avoir suffisamment de matériel pour tester différentes conditions d'exposition. En parallèle, des caractérisations immunohistochimiques ont été effectués afin de retrouver la présence des différents marqueurs décrits dans la publication princeps (Lancaster *et al.*, 2013).

Génération des organoïdes cérébraux humains

L'étape initiale du protocole de génération des MBs humains consiste par l'obtention de « corps embryoides » (EBs) c'est-à-dire des agrégats cellulaires à partir de cellules iPS.

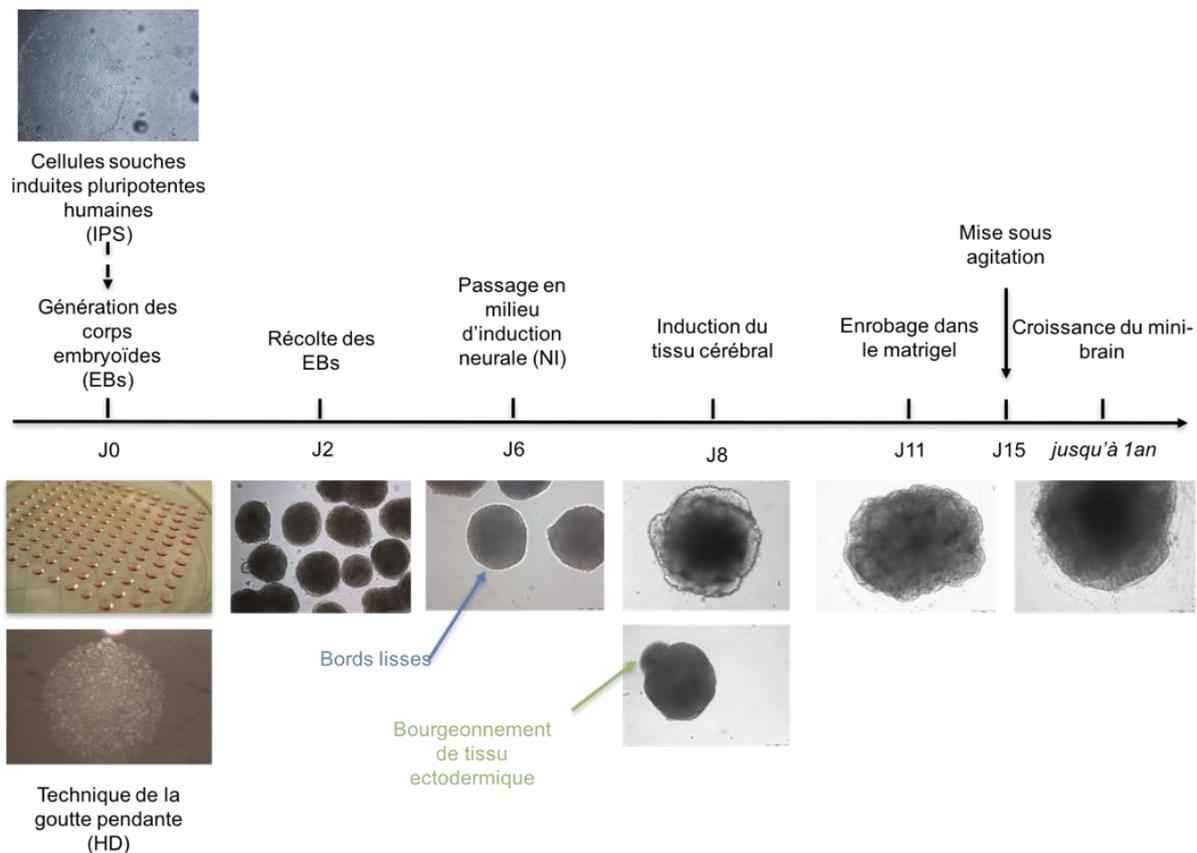


Figure 50 : Protocole de génération des organoïdes cérébraux humains adapté du protocole de Lancaster et son équipe (d'après Lancaster *et al.*, 2013).

Les corps embryoides (EBs) sont générés grâce à la technique de la goutte pendante (*Hanging drop*, HD). Les EBs sont ensuite placés successivement dans différents milieux de culture afin d'induire une différenciation neuroectodermique. Une sélection est opérée quotidiennement pour retirer les EBs ne répondant pas aux critères morphologiques, d'aspect et de taille. Une fois les EBs placés en Matrigel, les mini-brain (MBs) sont placés sous agitation permanente. La culture peut être maintenue jusqu'à un an en culture.

Une grande variabilité existe entre les EBs formés *in vitro*, et la première étape consiste donc à sélectionner ceux-ci sur la base de leur taille, leur morphologie et leur aspect général. Par exemple, seuls les EBs présentant des bords réguliers sont conservés (Figure 50). Les EB sélectionnés, de taille supérieure à 500 µm, sont ensuite cultivés dans un milieu induisant la formation du neuroectoderme (milieu d'induction neurale, Figure 48). Après ce stade, les organoïdes en formation sont placés manuellement et individuellement dans une goutte de Matrigel (un hydrogel favorisant la différenciation ultérieure en neuroectoderme), puis maintenus sous agitation rotative en présence d'acide rétinoïque. Au sein du laboratoire, les MBs humains ont été maintenus jusqu'à un an *in vitro*, et atteignent généralement un diamètre d'environ 3-4 mm. Lorsque les MBs ont été exposés à des souches de prions (exposition aiguë), ils ont été conservés 150 jours post-encapsulation en Matrigel.

Présence de marqueurs spécifiques du neurodéveloppement humain

Un total de 30 MBs issus de cellules iPS humaines ont été générés et caractérisés en IHC (Figures 51 ; 52 ; 53).

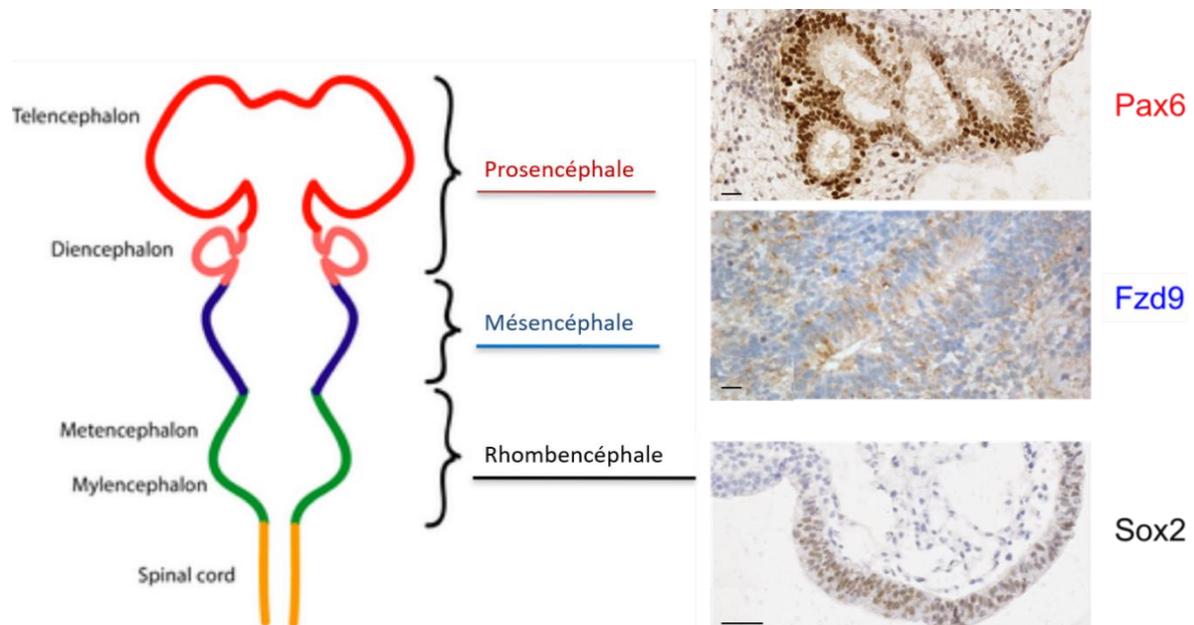


Figure 51 : Le modèle d'organoïde cérébral mime le neurodéveloppement humain. Les barres d'échelle représentent 50 µm.

Une des caractéristiques des MBs est leur capacité d'auto-organisation en 3D sous forme de structures compartimentalisées et mimant au plus près les différentes régions du cerveau humain (Figure 51A). En résumé, les MBs présentent au stade précoce de leur différenciation (30 jours après la mise en Matrigel) une expression importante de marqueurs des progéniteurs neuronaux (Sox2, Pax6). On peut noter la présence de marqueurs retrouvés au cours du neurodéveloppement humain dans les structures optiques (Pax6, Figure 51) ou hippocampique (Fzd9, Figure 51). Ces marqueurs diminuent au cours de la différenciation des MBs de façon concomitante à l'augmentation de l'expression des marqueurs neuronaux (Figure 52). Les marqueurs astrocytaires (GFAP) apparaissent plus tardivement au bout de 40 jours de culture post-Matrigel, et les marqueurs tels que la Nestine diminuent à ce stade.

L'expression endogène de la PrP^C dans les MBs humains apparaît dès les stades précoces de culture : dans les cellules iPS et dans les EBs (*résultats non montrés*). Dans les MBs, cette expression augmente au cours de la différenciation et est répartie de façon hétérogène à l'intérieur du MB (Figure 53).

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

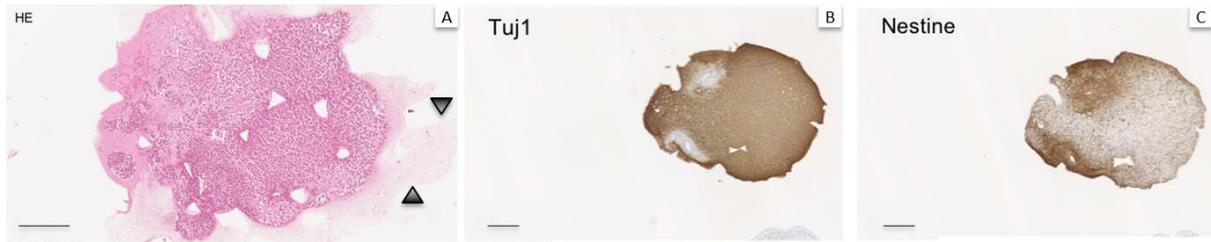


Figure 52 : Caractérisation immunohistochimique des organoïdes humains 30 jours après la mise en Matrigel.

A) Hématoxyline-éosine (HE). Immunodétection d'un mini-cerveau de 30 jours post-encapsulation en Matrigel de marqueurs neuronaux, anticorps anti-Tuj1 (B) et anti-Nestine. Les barres d'échelle représentent 200 μm .

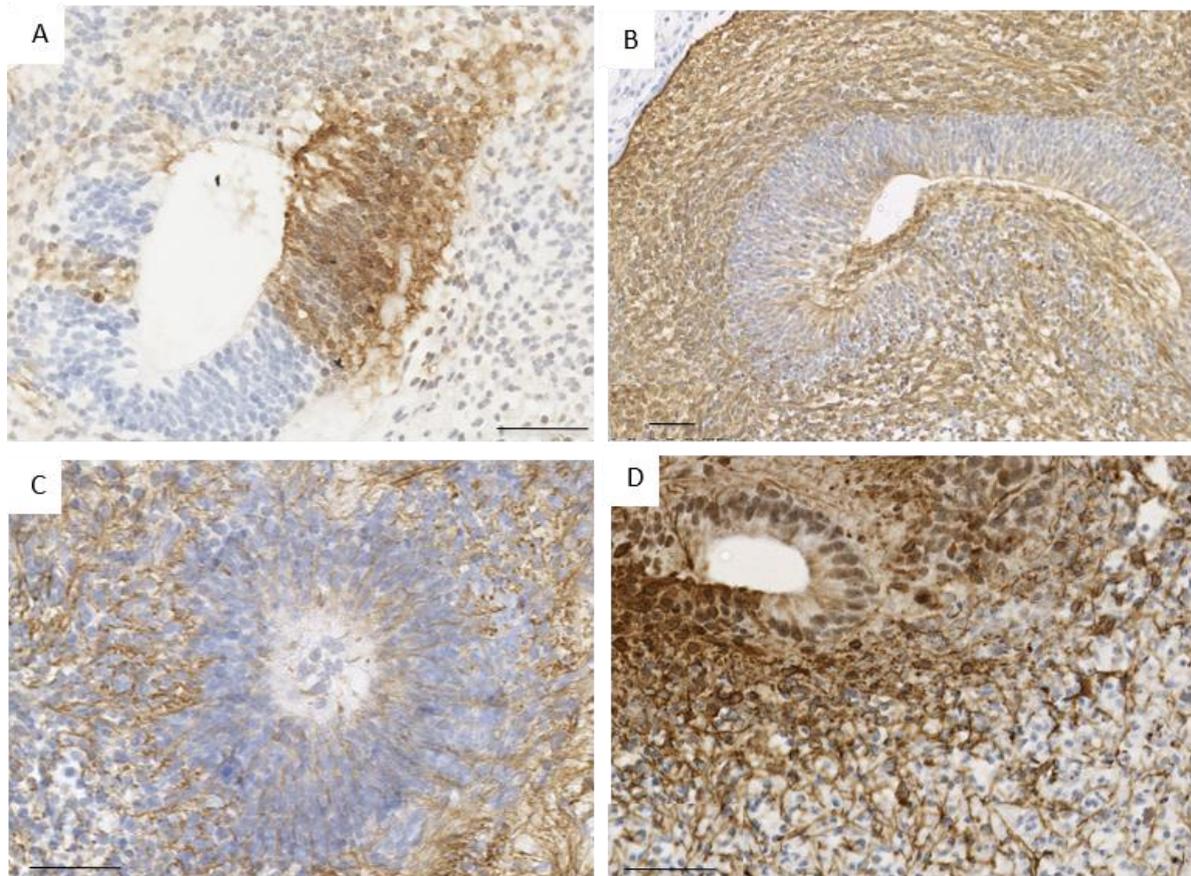


Figure 53 : Caractérisation immunohistochimique des organoïdes humains 45 jours après la mise en Matrigel.

A) Expression de la PrP^C (protéine prion cellulaire) endogène au mini-cerveau (MB) dès 10 jours après l'encapsulation en Matrigel. Immunodétection d'un mini-cerveau de 45 jours post-encapsulation en Matrigel de marqueurs neuronaux, anticorps anti-Tuj1 (B) et anti-Vimentine (C) et des astrocytes, anticorps anti-GFAP (D). Les barres d'échelles correspondent à 50 μm .

Sur la base des immunomarquages réalisés sur les MBs humains non exposés à des souches de prions, nous avons récapitulé un grand nombre des paramètres initialement observés dans l'étude de Lancaster et ses collaborateurs.

De manière notable, de faibles taux de MBs sont obtenus, illustrant une reproductibilité difficile tout comme le soulignait Lancaster et son équipe (Lancaster *et al.*, 2013). Dans nos mains, pour 200 corps embryoides (EBs) générés (Jour 0 : Figure 50) moins de 10% (en moyenne) seront inclus dans les protocoles d'infection prion.

2.2 Exposition chronique des organoïdes cérébraux humains : validation des MBs comme modèle d'infection prion

Ces résultats ont été pour partie présentés sous forme de poster au congrès Young Researchers in Life Science, YRLS (Paris, mai 2017) et un article est en cours de préparation.

Exposition à une souche sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

La première stratégie d'exposition a reposé sur une mise en contact chronique des MBs avec un échantillon infectieux afin de valider la pertinence de ce modèle dans l'étude des maladies à prions. Pour cela, un homogénat cérébral infectieux (souche sporadique de MCJ) a été mélangé dans le Matrigel servant de support à la culture en 3D des MBs. L'idée sous-jacente était de restreindre l'infectiosité au Matrigel qui est en contact permanent avec le MB dans les premiers stades de culture.

Dans la mesure où notre objectif a été de conserver cette organisation spatiale en 3D, proche du cerveau humain, nous avons été dans l'impossibilité technique de « passer » les cellules après exposition et donc d'éliminer la charge infectieuse résiduelle. Pour pallier à cela, une cinétique a été réalisée en récoltant les MBs à différents temps post-exposition (1, 30, 60 et 90 jpe).

Nous avons cherché à déterminer si l'infectiosité initialement ajoutée avait perduré dans les MBs. Pour cela, un bioessai a été effectué en inoculant les MBs exposés à des souris transgéniques permissives aux souches sporadiques de MCJ. Les MBs humains récoltés différents temps post-exposition ont été injectés en IC à des souris transgéniques, Tg650, sur-exprimant la PrP^C humaine. Au total deux MBs exposés au même inoculum et récoltés aux mêmes temps post-exposition ont été dilués (au total trois dilutions successives dans une solution de glucose) afin de déterminer le titre infectieux. Nos résultats mettent en avant une diminution de la durée de survie des souris ayant été inoculées avec les MBs exposés pendant 60 jours par rapport à celles ayant reçu des MBs exposés pendant moins longtemps (Figure 54A).

Sur la base de la présence de PrP^{res} dans le cerveau de ces souris, mise en évidence par technique ELISA, les taux de transmission ont été calculés pour chaque groupe, permettant ainsi d'estimer le titre infectieux des MBs exposés. Nous observons une augmentation du titre infectieux des MBs récoltés 60 jours post-exposition par rapport à celui des MBs exposés pendant 1 jour (correspondant à la charge initiale) (Figure 54B). Ces résultats suggèrent ainsi une génération *de novo* de PrP^{res} suite à l'exposition chronique à un isolat de souche sporadique de MCJ et permettent de valider la pertinence du modèle MB comme modèle *in vitro* d'infection prion.

Cette étude *in vivo* a été confirmée *in vitro* en utilisant un modèle d'amplification, la RT-QuIC qui offre l'avantage d'amplifier efficacement les souches sporadiques de MCJ. Grâce à cette technique réalisée en collaboration avec le Docteur Etienne Levavasseur (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris), des phénomènes d'agrégation dans les MBs humains exposés ont été observés non retrouvés dans les MBs contrôles (Figure 55). De plus, une agrégation plus importante dans les MBs exposés pendant 60 jours est observée par rapport à celle décrite dans les MBs récoltés à 1 et 30 jpe (Figure 55).

Ainsi, cette large étude nous a permis de souligner une augmentation de la charge infectieuse dans les MBs exposés pendant 60 jours par rapport aux temps plus précoces.

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

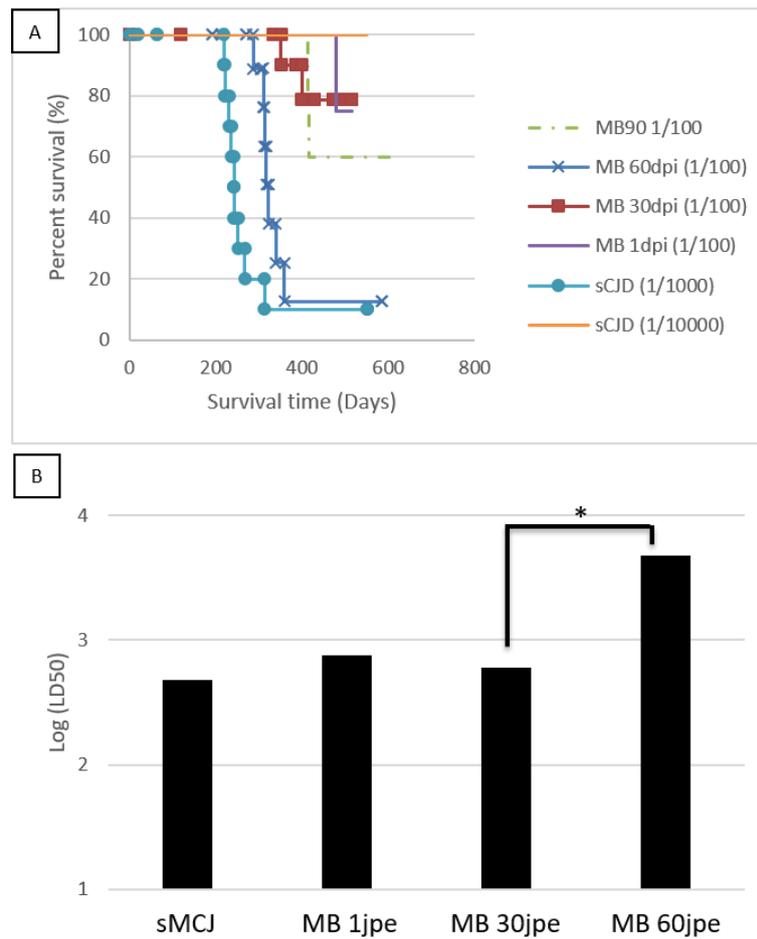


Figure 54 : Évolution de l'infectiosité contenue dans les MBs humains exposés de façon chronique à un isolat infectieux. Les mini-brains (MB) ont été exposés à un homogénat cérébral de macaque infecté par une souche sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sMCJ). A) Courbe de survie des souris humanisées Tg650 (surexprimant la PrP^C humaine) inoculées avec des MBs dilués 100 fois (analyse en Kaplan Meier). B) Analyse des titres infectieux des MBs exposés (à un isolat de sMCJ) grâce à la méthode de Reed et Muench.

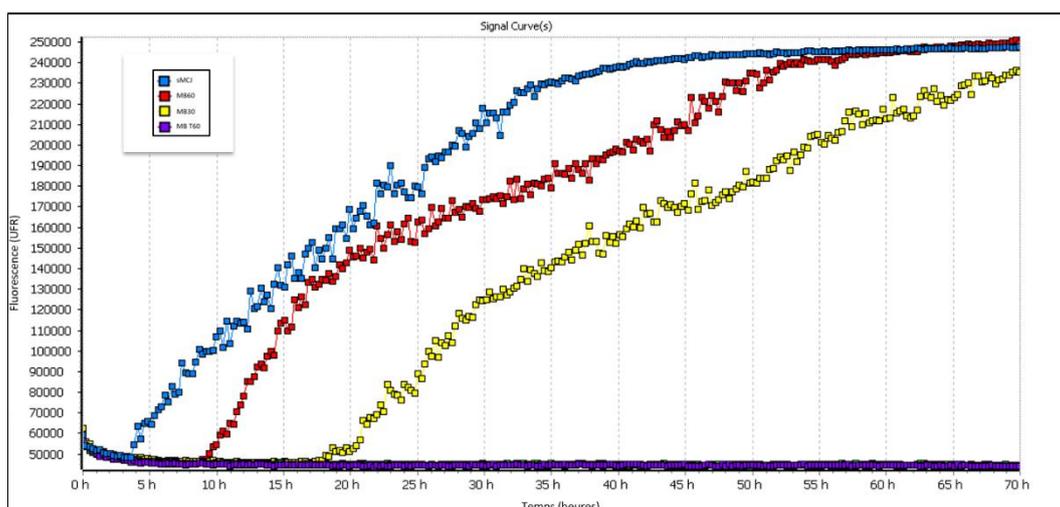


Figure 55 : Conversion de la protéine prion recombinante par les mini-brains en RT-QuIC. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec le Dr Etienne Levavasseur (ICM, Paris). Une fois les MBs exposés à une souche sporadique (bleu), ils ont été récoltés 30 (MB30, jaune) et 60 (MB60, rouge) jours post exposition. Un mini-cerveau exposé pendant 60 jours à un homogénat sain (MB T60, en violet) a été analysé et ne présentait aucun phénomène anormal d'agrégation. UFR : unité de fluorescence relative.

Exposition à une souche de variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

En parallèle des MBs humains exposés de façon chronique avec une souche sporadique de MCJ, 20 MBs humains ont été exposés avec une souche de vMCJ (Tableau 27). La moitié d'entre eux a été fixée en formol pour analyses IHC et l'autre moitié a été congelée pour analyses en WB. Aucun de ces MBs exposés à des souches vMCJ n'a été inoculé à des souris, afin de limiter le nombre d'animaux, avant d'avoir validé à l'aide d'autres techniques la présence de PrP anormale dans cette condition.

Tableau 27 : Nombre de mini-brains humains exposés de façon chronique dans le Matrigel.

JPE	Témoin négatif	sMCJ	vMCJ
1	4	3	3
3	2	1	1
7	2	1	1
20	4	4	4
30	4	4	4
60	4	4	4
90	4	3	3

sMCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob forme sporadique – vMCJ : variante de la MCJ.

Détection de la PrP anormale en IHC et techniques biochimiques

En plus des analyses des MBs exposés à une souche sporadique (bioessai et RT-QuIC), des immunomarquages ont été réalisés sur les MBs humains exposés de façon chronique (sMCJ et vMCJ) (Figure 56). Cette technique réalisée, à l'aide de deux anticorps anti-PrP à savoir Sha 31 (PrP^C 145 - 152) et Saf32 (59 - 89), n'a pas été concluante car nous n'avons pas trouvé de conditions expérimentales nous permettant d'obtenir un marquage différentiel entre la PrP^C et la PrP anormale. Des analyses biochimiques en WBs et en dot blot ont été effectuées en récoltant les MBs directement sous forme de culot cellulaire. Dans ces conditions, aucune PrP^{res} néoformée n'a été observée (Figure 57). La dose de PK nécessaire pour éliminer la présence de PrP^C endogène des MBs a été déterminée, mais celle-ci a également conduit à l'élimination de la PrP anormale. Ces résultats in vitro suggèrent ainsi que l'infectiosité néoformée dans ces MBs n'est pas associée à des formes agrégées de PrP anormale résistantes à la protéolyse.

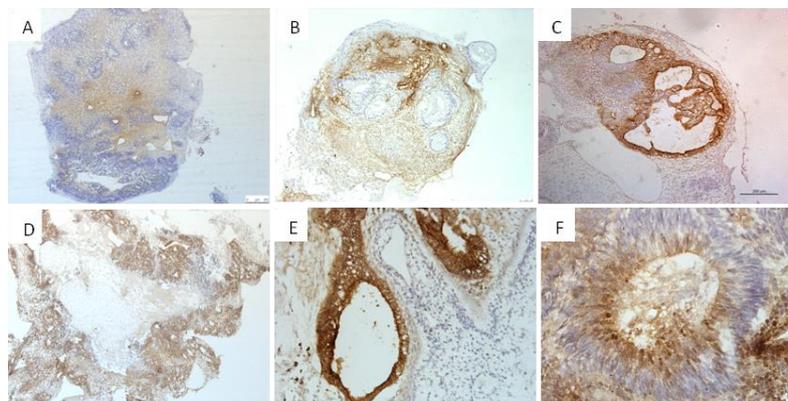


Figure 56 : Absence de distinction entre la PrP^C endogène des organoïdes humains et la PrP anormale initialement ajoutée ou potentiellement néoformée.

A) Mini brain non exposé (30 jours post-encapsulation en Matrigel ; barre d'échelle correspond à 250 µm). Mini-brains exposés chroniquement (encapsulation de l'infectiosité dans le Matrigel) à un homogénat sain pendant 1 jour (B ; 75 µm) et 30 jours (C ; 200 µm). Mini-brains exposés chroniquement à une souche de prion sporadique pendant 1 jour (D ; 100 µm) et 30 jours (E ; 25 µm) et pendant 30 jours à une souche vMCJ (F ; 25 µm). Immunomarquages avec l'anticorps anti-Sha31.

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

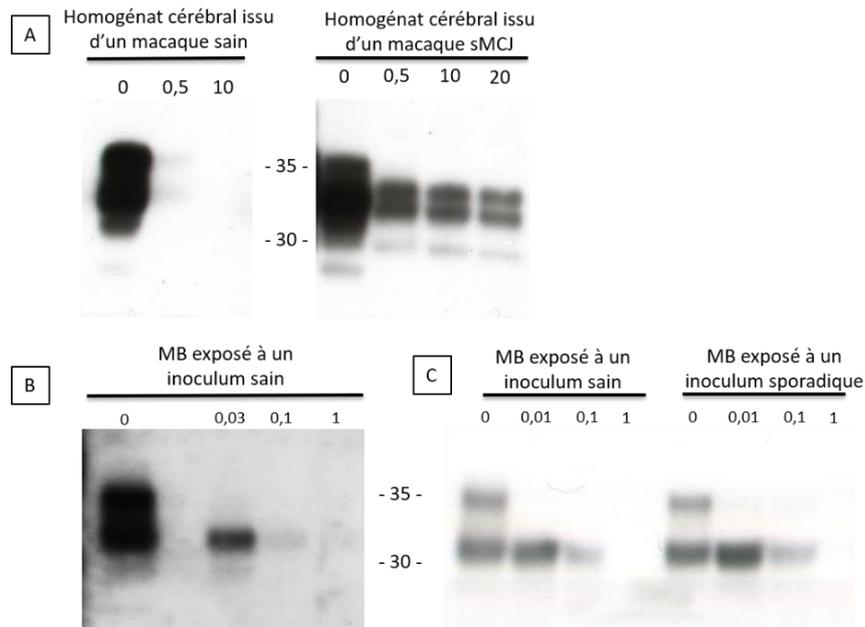


Figure 57 : Détection de la PrP^{res} dans les organoïdes cérébraux humains exposés.

A) Inocula issus d'un macaque sain et exposé à un isolat d'une souche sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (sMCI), B) en fonction de différentes doses de protéinase K (PK). La valeur 1 correspond à 0,3 µg/ ml. B) Mini-brains (MBs) humains exposés à des inocula sains (B) et infectieux (C).

Étude préliminaire de la cytotoxicité

Nous avons également déterminé si le modèle MB pouvait permettre d'évaluer les effets cytotoxiques suite à l'exposition à des souches humaines de prions grâce à la technique TUNEL (Figure 58). Bien que quelques cellules en apoptose soient observées dans les MBs témoins (moins de 10%, Figure 58C), un nombre plus important est observé dans les MBs exposés (vMCI et sMCI de façon équivalente). Ce travail devra être étendu à d'autres MBs exposés pendant des durées plus longues (notamment pendant 60 jours) et d'autres techniques devront être réalisées (caspase 3 clivée, annexine V, dégradation de l'ADN en échelle...).

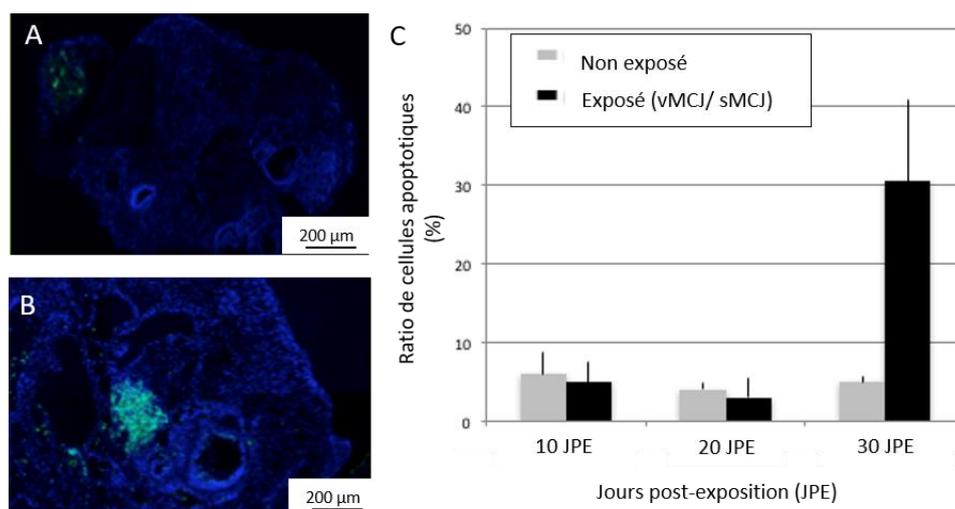


Figure 58 : Augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques dans les mini-brains humains exposés à des souches de prions humaines.

Immunodétection par fluorescence des cellules apoptotiques (vert) et des noyaux (DAPI, bleu) grâce à la technique TUNEL dans un mini-brain témoin (non exposé, A) et exposé à une souche sporadique de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCI, B). C) Ratio de cellules apoptotiques dans les mini brains exposés pendant différents temps (n = 2 par condition).

2.3 Obtention et caractérisation des organoïdes murins et simiens

La génération d'organoïdes simiens et murins a été un réel défi dans la mesure où personne n'a été en mesure pour l'heure de générer ces structures en 3D à partir de cellules iPS autres qu'humaines. Ainsi, une partie de mon travail a consisté à générer des organoïdes neuro-ectodermiques en 3D :

- **Simiens** afin de tester les différentes souches présentes au laboratoire, de macaques classiques et atypiques ; en s'affranchissant du phénomène de barrière d'espèce ;
- **Murins** afin d'optimiser le protocole d'infection en utilisant des souches plus sensibles et rapides, et également pour obtenir des organoïdes à partir de souris PrPKO.

Organoïdes murins

Afin de pouvoir générer différents organoïdes murins, des fibroblastes et des cellules de la moelle osseuse de souris Tg338, C57Bl/6 et PrPKO (Figure 60) ont été isolés. Les cellules PrPKO (fibroblastes et cellules de la moelle osseuse) ont eu une croissance trop lente qui n'a pas permis d'amplifier suffisamment de cellules afin d'initier le processus de reprogrammation. Dans la mesure où nous avons différentes expériences réussies dans la reprogrammation de fibroblastes (R. Jarray), nous avons privilégié ces cellules. Seuls les fibroblastes des souris Tg338 ont été reprogrammés (Figure 59). Une lignée contrôle de cellules souches pluripotentes murines (cellules embryonnaires obtenues à partir de C57Bl/6) a été obtenue auprès du Docteur Leila Maouche-Chrétien.

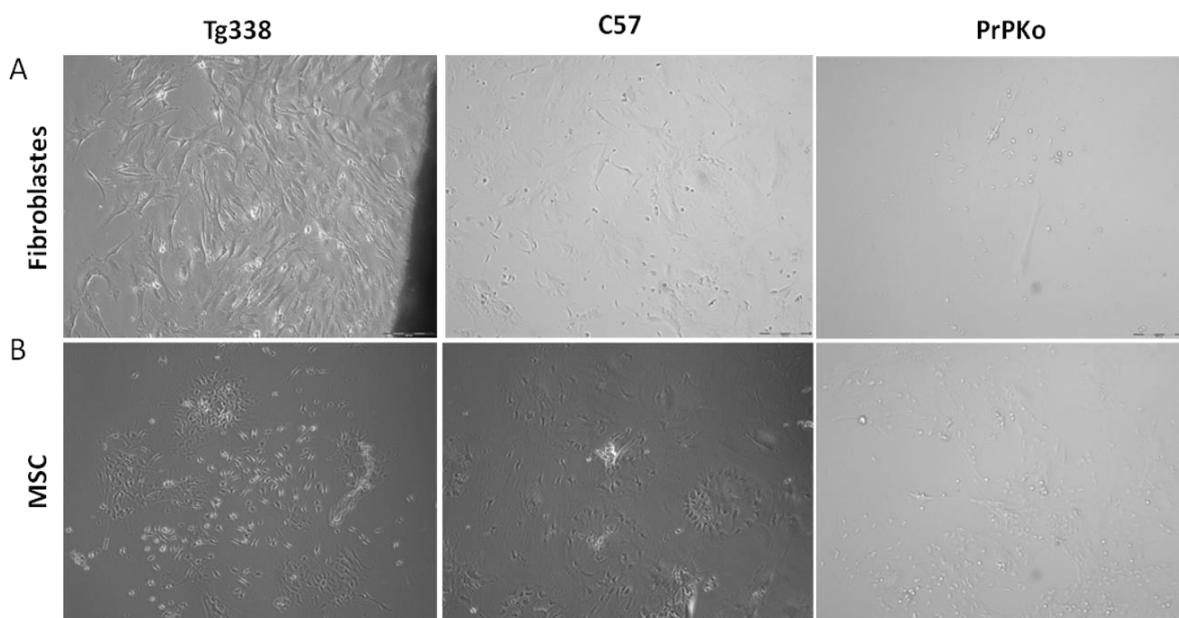


Figure 59 : Cellules murines extraites soit de la moelle osseuse soit de biopsie cutanée.

Trois lignées murines ont été utilisées : des souris transgéniques, Tg338 (sur-exprimant la PrP^C ovine sans expression endogène), des souris conventionnelles, C57Bl6 et délétées pour le gène Prnp codant pour la protéine prion (PrP), PrPKO. MSC : cellules souches de la moelle osseuse. Les barres d'échelle représentent 200 μ m.

L'aspect morphologique des colonies iPS338 (Figure 60F) diffère par rapport aux cellules souches embryonnaires ESC57. Malgré cela, nous avons réussi à générer des EBs (une des caractéristiques des cellules souches pluripotentes) et des organoïdes issus de ces deux types cellulaires (Figure 61). En parallèle, la génération de tératomes (n=4) dans des souris NSG n'a pas permis de mettre en évidence les trois feuilletts embryonnaires. Néanmoins, trois coupes par tératome (distantes de 50 μ m chacune) ont été réalisées, il serait donc pertinent d'analyser plus de coupes.

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

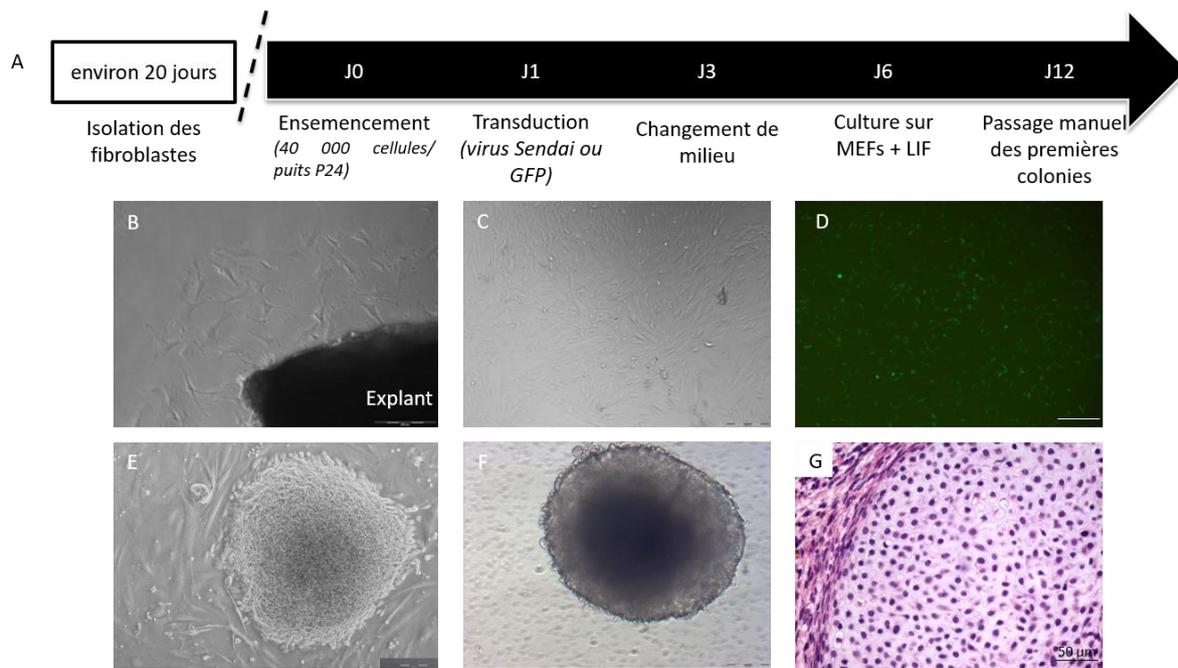


Figure 60 : Les cellules iPS 338 murines partiellement reprogrammées.

A) Mode opératoire d'obtention des cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes de souris transgéniques Tg338, surexprimant la PrP^C ovine. B) Sortie des fibroblastes de l'explant cutané d'une souris Tg338. C) Tapis de fibroblastes murins au bout de 15 jours de culture. D) Fibroblastes murins transduits par le vecteur codant pour la protéine fluorescente, GFP. E) Colonies iPSC338. F) Corps embryoïdes réalisés grâce à la technique de la goutte pendante. G) Hématoxyline-éosine de tumeur prélevée sur une souris immunodéficiente NSG suite à l'inoculation en sous cutanée des cellules iPS 338. Les barres d'échelle représentent 200 µm.

La recherche des marqueurs de pluripotence dans les cellules iPS338 reprogrammées au sein du laboratoire a été réalisée en étudiant l'expression de différents gènes endogènes : *Sox2*, *Nanog* et *Rex-1* par PCR (Figure 61). Ces marqueurs sont fortement exprimés dans les cellules ESC57 à un passage précoce (P22) et plus faiblement à un passage plus tardif P24, signe éventuel d'une modification de ces marqueurs au cours de la culture. De manière notable, ces marqueurs ne sont pas exprimés dans les cellules iPS 338. La présence du marqueur SSEA-4 en cytométrie de flux dans ces cellules a également été recherchée, mais sans succès (*résultats non montrés*). Toutefois, ces deux analyses ont été réalisées une seule fois et sur un seul clone de cellules à un passage cellulaire précoce. Actuellement, les cellules iPS 338 sont en cours d'adaptation à un passage plus tardif (P30).

L'absence des différents marqueurs de pluripotence peut être interprétée de plusieurs façons (Figure 61) : (i) la technique de reprogrammation avec le virus de Sendai et les gènes humains (OSKM), classiquement utilisés pour les cellules humaines, est difficilement transposable aux cellules murines (ii) le processus de reprogrammation est incomplet, ayant abouti à des cellules partiellement reprogrammées, comportant un nombre limité de caractéristiques des cellules souches, nécessitant de maintenir les cellules iPS plus longtemps en culture et d'analyser une nouvelle fois ces cellules.

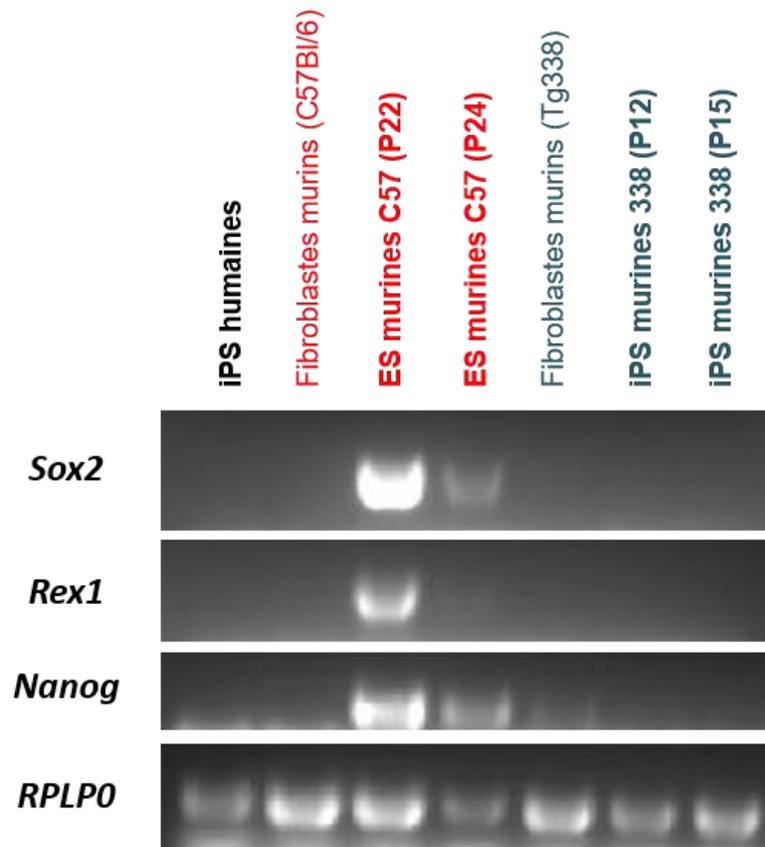


Figure 61 : Expression endogène des marqueurs de pluripotences dans les cellules murines par PCR. Détection des marqueurs de pluripotence par PCR : *Sox2*, *Rex-1* et *Nanog*. Le gène *RPLP0* a été utilisé à titre de contrôle comme un « gène de ménage ».

Une caractérisation plus complète des cellules iPS 338 partiellement reprogrammées pourrait se révéler intéressante pour décrire le stade de reprogrammation de ces cellules. Bien que ces cellules aient subi une reprogrammation partielle, des progéniteurs neuronaux (expression de marqueurs tels que NeuN en IHC) ont été trouvés.

Les organoïdes simiens

Ces cellules, obtenues en collaboration auprès du docteur Leila Maouche-Chrétien, possèdent des particularités notables par rapport aux cellules iPS humaines. Pour vérifier que nos conditions de culture étaient adaptées, ces cellules ont été inoculées par voie sous-cutanée à trois souris NSG afin de former des tératomes. Les trois tératomes produits ont tous conduit à l'obtention de la différenciation vers les trois feuilletts embryonnaires (ecto-, méso- et endo-derme : Figure 62).

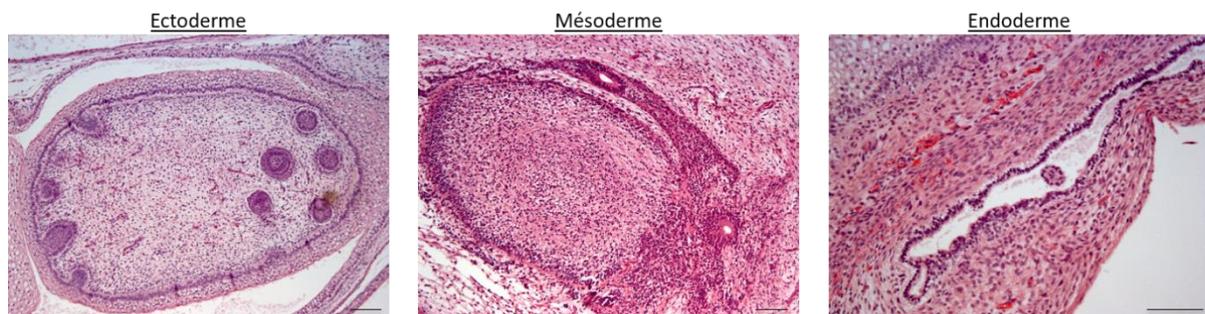


Figure 62 : Trois feuilletts primaires d'un tératome issu de cellules souches pluripotentes induites simiennes. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

Comparaison des trois modèles d'organoïdes

Les trois lignées de cellules iPS (humaines, simiennes et murines) ne se cultivent pas de la même façon et des différences en termes d'aspect des colonies ont été observées (Figure 63).

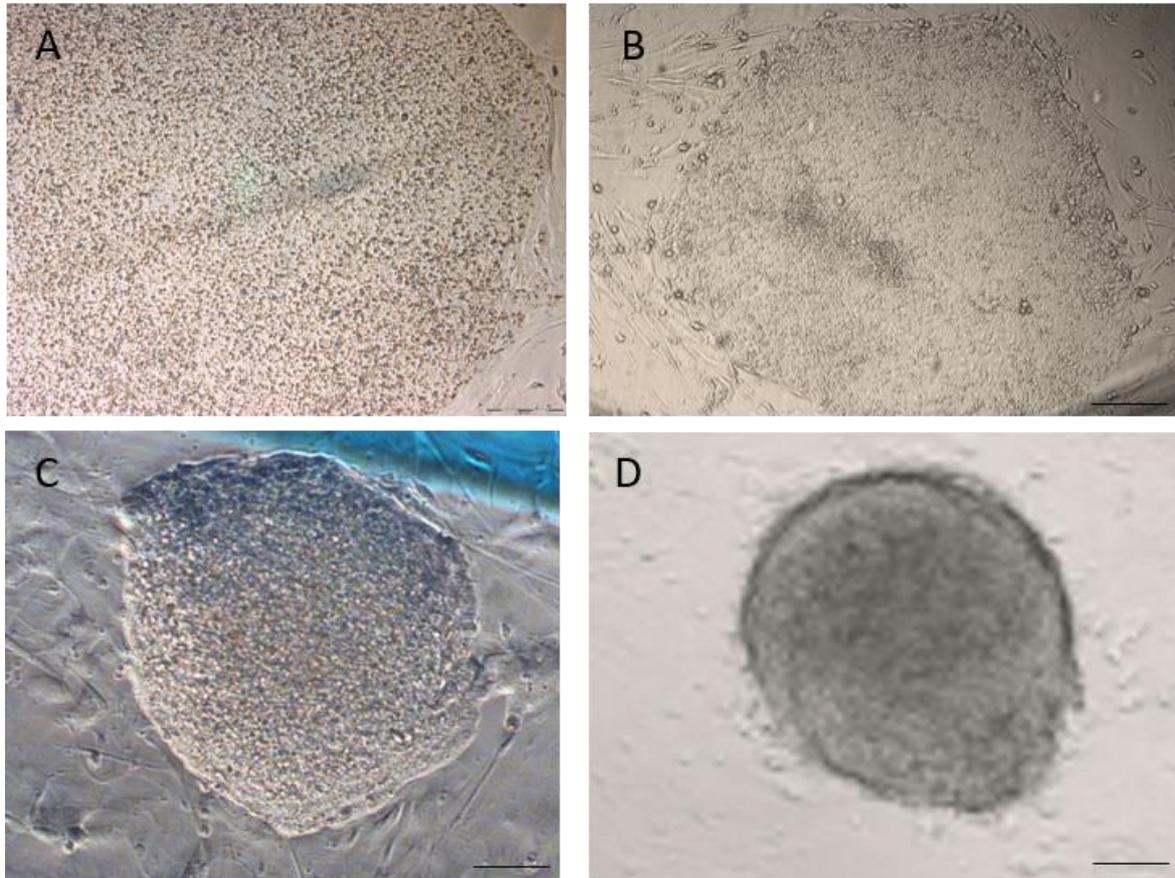


Figure 63 : Aspect des colonies des cellules souches humaine, simienne et murines cultivées sur support nourricier.

A) Cellules souches pluripotentes induites (iPS) humaines cultivées sur fibroblastes embryonnaires murines (MEF). B) Cellules iPS simiennes. C) Cellules embryonnaires murines issues de souris C57Bl/6 (ES C57). D) Cellules partiellement reprogrammées (iPS338) issues de souris transgéniques Tg338 (sur-exprimant la protéine prion cellulaire ovine). Les barres d'échelle correspondent à 200 μ m (A – B) et 100 μ m (C – D).

De façon équivalente, des différences au niveau de la génération des organoïdes ont été observées. Les organoïdes issus des cellules murines (ES C57 et iPS 338) atteignent une taille plus importante et plus rapidement que les deux autres modèles (Figure 64).

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

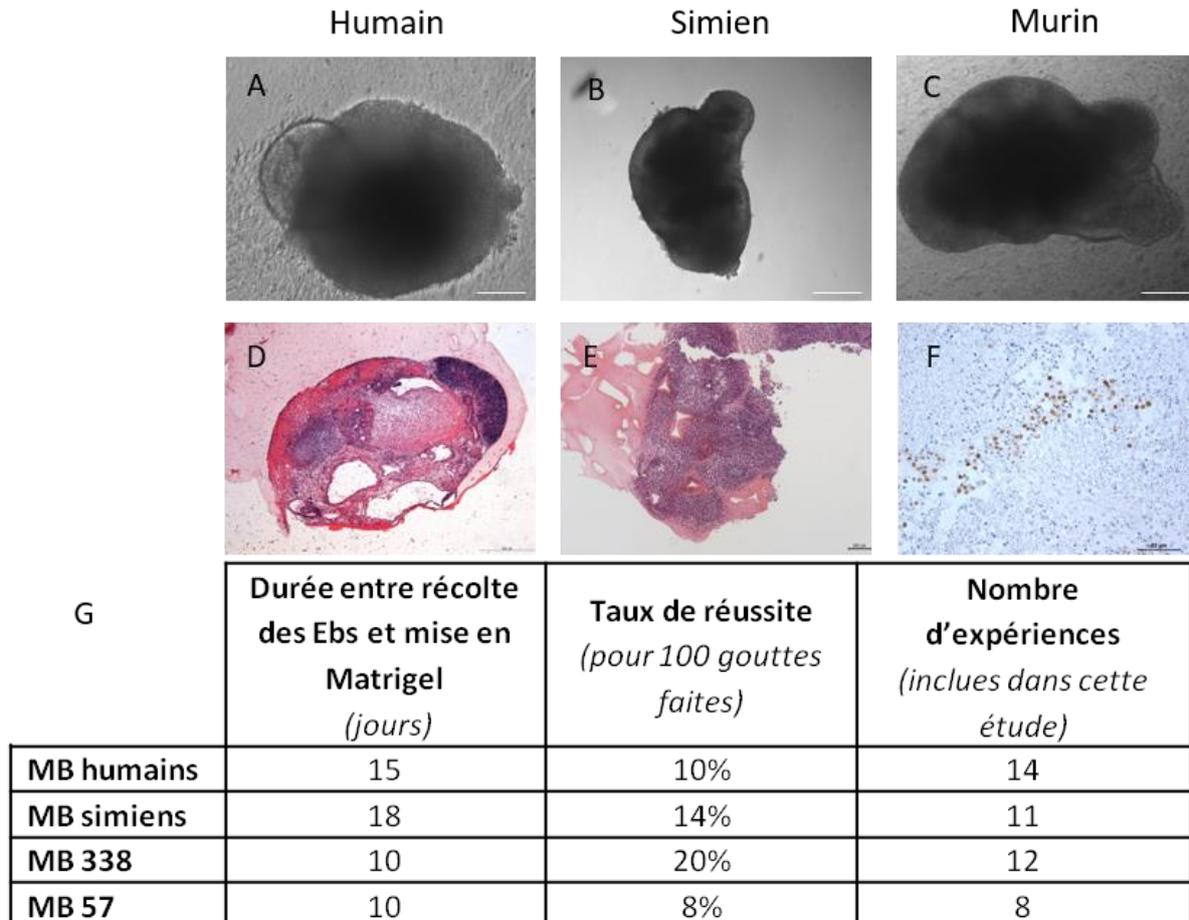


Figure 64 : Comparaison des mini-brains issus de cellules humaines, murines et simiennes.

Images microscopiques après la mise en Matrigel des organoïdes cérébraux issus de cellules souches pluripotentes induites (iPS) humaines (A), simiennes (B) et murines 338 (C). Colorations en hématoxyline-éosine des organoïdes humain (D) et simien (E). Immunomarquage des cellules neurales dans un organoïde murin issu de cellules iPS 338 (F). G) Pourcentage de réussite de génération des organoïdes neuroectodermique en fonction des origines des trois espèces cellulaires utilisées. Les barres d'échelle correspondent à 100 µm (A – C), 500 µm (D), 200 µm (E) et 50 µm (F).

2.4 Exposition aiguë des organoïdes neuroectodermiques

Une fois les organoïdes humains, simiens et murins générés et caractérisés, nous avons mis en place une stratégie d'infection (Figure 65) différente de celle utilisée précédemment.

Cette nouvelle stratégie a été optimisée en utilisant des organoïdes présentant une différenciation plus tardive conduisant à l'élimination complète de la capsule de Matrigel. En effet, il a été mis en évidence qu'au fil de la culture, le Matrigel s'éliminait (en moyenne 30 jours post-encapsulation en Matrigel). L'objectif est de permettre à l'infectiosité ajoutée une meilleure pénétration dans les sphéroïdes et qu'elle ne soit pas « stoppée » ou « piégée » dans le Matrigel.

La seconde optimisation repose sur l'introduction des billes d'un diamètre de 300 nm (Ademtech Carboxyl-Ademtech, 0213). Notre hypothèse est que ces billes puissent accélérer le processus anormal de réplication de la PrP par phénomène de *seeding* (E. Sanfins).

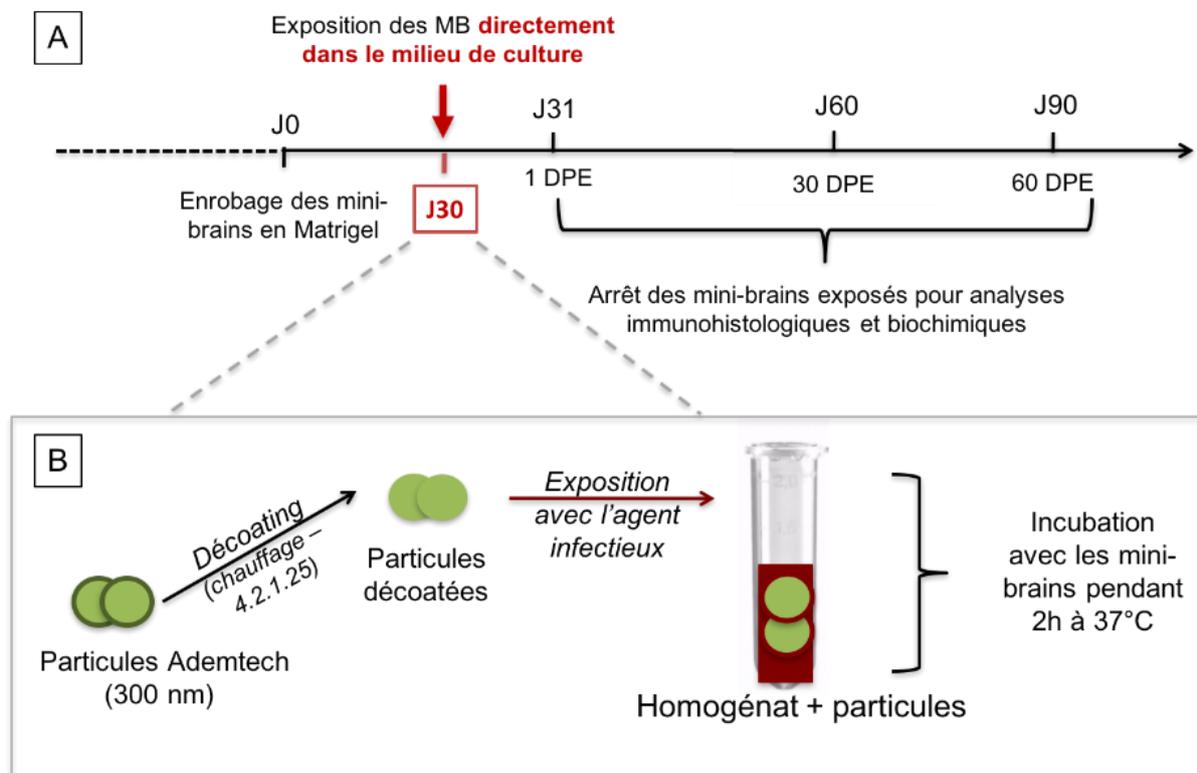


Figure 65 : Protocole d'exposition aiguë des organoïdes humains, murins et simiens.

A) Exposition des mini-brains (MB) directement dans le milieu de culture 30 jours après la mise en Matrigel. Les MBs exposés sont récoltés pour analyses 1/30/60 jours post-exposition (JPE). B) Les billes Ademtech (Ademtech Carboxyl-Ademtech) sont préalablement décoatées puis mise en contact avec l'agent infectieux. L'ensemble de cette solution (homogénat infectieux et billes) est exposé sur les MBs pendant 2h à 37°C.

Organoïdes cérébraux humains

La première étape a consisté à vérifier la capacité des billes à pénétrer dans les MBs (Figure 66). Ces optimisations réalisées sur les MBs humains, nous ont permis de déterminer la quantité de billes suffisante pour entrer dans les MBs sans ralentir la croissance de ces derniers (condition B).

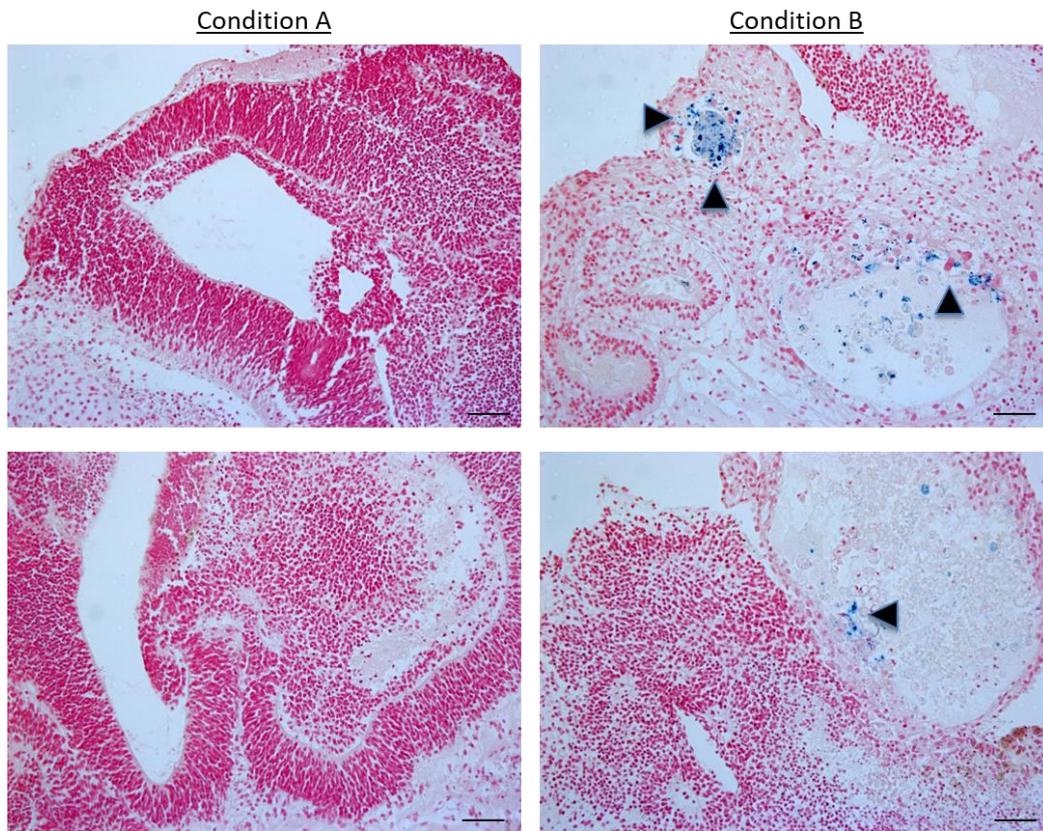


Figure 66 : Coloration Perls sur les Mini-brains exposés à deux concentrations de billes Ademtech.

Avec la condition B, la quantité de billes initialement ajoutée est suffisante pour être détectée un jour post-exposition ainsi que quatre jours post-exposition (coloration bleue, matérialisée par un triangle noir). Les barres d'échelles représentent 50 μ m.

Un total de 54 MBs humains a été inclus dans cette étude (Tableau 28). Contrairement à la première stratégie d'exposition (chronique), ces MBs n'ont pas été inoculés à l'animal de laboratoire et le titre infectieux n'a donc pas été calculé. Les données en RT-QuIC soulignent des phénomènes d'agrégations anormaux dans les MBs exposés non retrouvés dans les MBs exposés à des homogénats sains et non exposés (Figure 67).

Tableau 28 : Nombre total de Mini-brains humains exposés directement dans le milieu de culture (exposition aiguë) à différentes souches de prion.

JPE	Témoin négatif	sMCJ	vMCJ
1	6	6	6
30	6	6	6
60	6	6	6

vMCJ : variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, sMCJ : forme sporadique de la MCJ

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

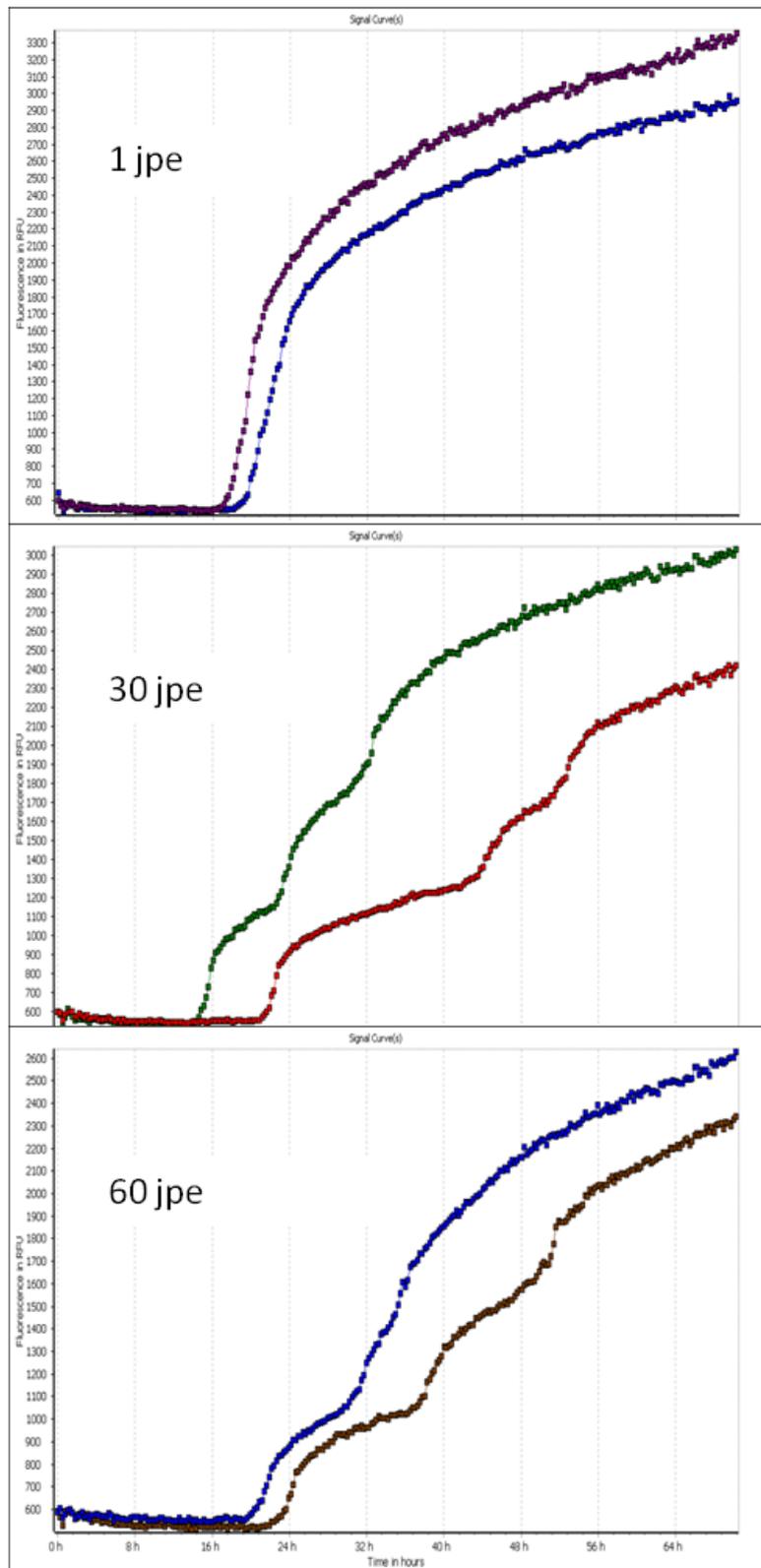


Figure 67 : Conversion de la protéine prion recombinante par les mini-brains humains exposés à une souche sporadique directement dans le milieu de culture en RT-QuIC.

Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec le Docteur Etienne Levavasseur (ICM, Paris). Une fois les MBs humains exposés à une souche sporadique dans le milieu de culture, ils ont été récoltés 1 (correspondant à la charge initiale), 30 et 60 jours post exposition (jpe). Deux mini-brains par conditions ont été testés et des triplicats ont été réalisés par cycle d'amplification.

Les données obtenues en RT-QuIC sur les MBs humains exposés directement dans le milieu de culture (aiguë) soulignent une amplification efficace de la souche sporadique de la MCJ dans les trois conditions testées (1, 30 et 60 jpe) (Figure 67). La comparaison de ces trois graphiques suggère des phénomènes d'agrégation plus importants dans les MBs exposés pendant 1 jour (phase exponentielle à 16h) par rapport aux deux autres conditions. Cette diminution suggère une élimination de la PrP anormale initialement ajoutée (1 jpe) au cours de la différenciation des MBs. Ainsi, cette stratégie ne semble pas être efficace mais une persistance de l'amplification de la souche sporadique MCJ est retrouvée 60 jpe.

Organoïdes murins

Comme décrit précédemment, le modèle d'infection des MBs humains est encore à optimiser afin de valider que l'augmentation du titre infectieux décrite dans les souris Tg650 inoculées avec les MBs humains (stratégie chronique) (Figure 54) est liée à une PrP *de novo* et non résiduelle. Pour déterminer à quel moment la PrP anormale initialement ajoutée s'élimine, notre perspective était de générer des MBs PrPKo. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de reprogrammer ces cellules (Figure 59).

Notre deuxième stratégie a consisté à utiliser des cellules murines connues pour répliquer plus facilement la PrP *in vitro*. Des organoïdes murins à partir de cellules souches embryonnaires issues de souris C57Bl/6 (notés MBC57) et de cellules iPS issues de souris Tg338 (notés MB338) ont été générés et exposés à deux souches de tremblante (Tableau 29). Ces deux modèles cellulaires murins ont été exposés à une souche de tremblante expérimentale (TAC), à laquelle les souris Tg338 sont sensibles mais pas les souris C57Bl/6 (Figure 68). Nous avons émis l'hypothèse que le même phénomène de susceptibilité puisse être retrouvé *in vitro*.

Tableau 29 : Nombre d'organoïdes murins exposés directement dans le milieu de culture (exposition aiguë) à différentes souches de prion adaptées à la souris.

	MB338			MBC57		
	1 jpe	30 jpe	60 jpe	1 jpe	30 jpe	60 jpe
Non exposé	10	10	10	10	10	10
Témoin négatif	3	3	3	3	3	3
TAC	6	6	6	6	6	6
C506M3	6	6	6	6	6	6

À l'instar des expériences *in vivo* réalisées avec les MBs humains exposés, nous avons déterminé si les organoïdes murins étaient en mesure de répliquer l'infectiosité. Seuls les MB338 et MBC57 exposés à la souche de tremblante ont été inoculés par voie IC à des souris Tg338 (Figure 68).

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

Nos données suggèrent que l'infectiosité est maintenue dans le modèle MB338 et diminue dans les MBC57. Ainsi, ces résultats vont dans le sens de la validation du modèle MB comme modèle d'infection *in vitro* par des souches de prion (Figure 68). En parallèle, des optimisations sont en cours afin d'amplifier la PrP anormale directement dans les organoïdes murins exposés en RT-QuIC.

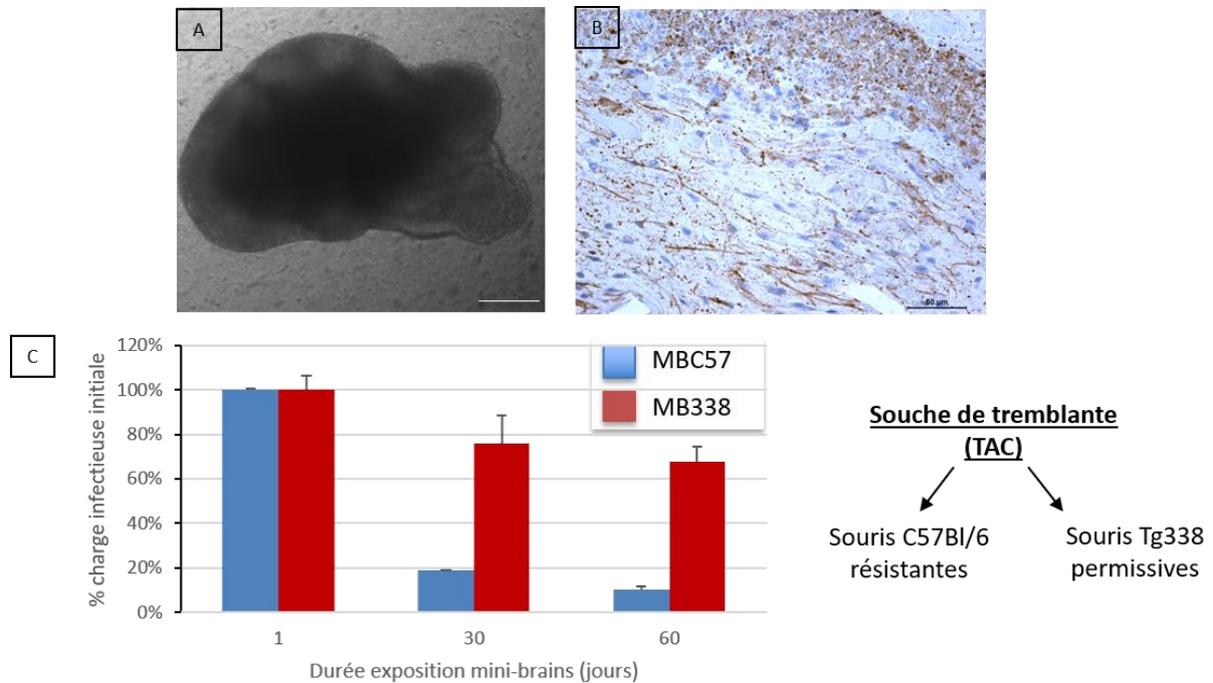


Figure 68 : Organoïdes murins exposés de façon aiguë à une souche de tremblante adaptée.

A) Image microscopique d'un organoïde murin issu des cellules souches iP3338 (MB338). B) Immunomarquage des cellules neurales (anticorps anti-Tuj1). C) Titre infectieux dans les souris Tg338 exposés soit aux organoïdes neuro-ectodermiques issus des cellules ESC57 (MB C57, rouge) iP3338 (MB338 en bleu). Les barres d'échelle correspondent à 100 µm (A) et 50 µm (B).

Organoïdes simiens

Les organoïdes simiens ont été exposés à deux isolats infectieux (sporadique et vMCJ) ainsi qu'à un homogénat provenant d'un macaque sain (Tableau 30). Pour l'heure, la recherche de la réplication anormale n'a pas été concluante en WB, IHC ni même en RT-QuIC.

Tableau 30 : Exposition des organoïdes issus des cellules souches pluripotentes simiennes.

Nombre d'organoïdes neuro-ectodermiques issus de cellules souches pluripotentes induites simiennes exposés avec la stratégie aiguë.

	1 jpe	30 jpe	60 jpe
Non exposé	10	10	10
Témoin négatif	3	3	3
vMCJ	6	6	6
sMCJ	6	6	6

3- Discussion de l'étude B : modèle d'exposition en 3D

Les modèles *in vivo* notamment murins et simiens restent des outils indispensables pour étudier les mécanismes de barrière d'espèce, de transmission et d'adaptation de souches. Néanmoins, face aux contraintes techniques et aux enjeux éthiques de société qu'ils représentent, il convient de mettre en place des modèles d'infection alternatifs à l'expérimentation animale. L'intérêt est de pouvoir disséquer les mécanismes cellulaires de formation de PrP ainsi que tester de nouvelles molécules thérapeutiques. La majorité des modèles cellulaires proposés dans la littérature sont basés sur l'utilisation de cellules murines exposées à des souches de prions adaptées (Grassmann *et al.*, 2013). Peu d'études ont réussi à répliquer des souches de prion humaines *in vitro*. Une des alternatives a consisté à utiliser des cellules issues de souris humanisées sensibles aux souches humaines de prions (Cronier *et al.*, 2007 ; Hannaoui *et al.*, 2014). La modification du gène *Prnp* dans ces modèles *in vivo* permet toutefois de poser la question de la pertinence de ce modèle par rapport à la physiologie humaine. De plus, il a été souligné l'importance de modéliser les interactions neurones-cellules gliales connues pour être impliquées dans les maladies neurodégénératives (Gomez-Nicola *et al.*, 2013 ; Hennessy *et al.*, 2015 ; Aguzzi et Liu, 2017 ; Aguzzi et Zhu, 2017).

Au commencement de mon projet de thèse, aucune étude n'avait réussi à répliquer des souches humaines de prion dans des cellules d'origine humaines. Cela nous a conduit à proposer un nouveau modèle cellulaire d'infection reposant sur la technologie innovante des organoïdes cérébraux (Mini-brains, MBs) initialement mise au point en 2013 (Lancaster *et al.*, 2013). Ces structures en trois dimensions présentent des avantages ainsi que des limites résumées dans la figure 69 par rapport aux cultures classiques (en monocouche ou même en neurosphères).

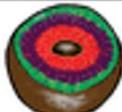
	 CULTURE EN MONO-COUCHE	 NEUROSPHÈRE	 ORGANOÏDE CÉRÉBRAL
Avantages	Rapide et facile Peu couteux Étude à large échelle	Rapide et facile Culture en 3D : interaction cellule-cellule	Organisation en 3D complexe : mime le neurodéveloppement humain Hétérogénéité cellulaire
Inconvénients	Un seul type cellulaire (sauf co-culture)	Aucune organisation Hétérogénéité d'une neurosphère à l'autre	Difficile, long, couteux Chaque organoïde est unique Étude à large échelle limitée

Figure 69 : Principaux avantages et inconvénients des cultures cellulaires en deux et trois dimensions (d'après Qian *et al.*, 2017).

3.1 Caractérisation des modèles cellulaires

Modèle d'organoïde cérébral humain

La caractérisation IHC des MBs obtenus au laboratoire nous a permis de valider la présence des différents marqueurs décrits dans la publication princeps. En résumé, les organoïdes expriment durant les stades précoces de différenciation des marqueurs de progéniteurs neuronaux, puis au cours de la culture acquièrent des marqueurs neuronaux et gliaux. La caractérisation des MBs pour cette étude s'est limitée à une analyse phénotypique par immunomarquage et par PCR. En effet, aucune étude de fonctionnalité n'a été réalisée telle que, par exemple, l'analyse des potentiels d'action des neurones matures générés.

Par ailleurs, les organoïdes cérébraux sont issus de la différenciation des cellules iPS vers un lignage neuroectodermique ce qui implique une absence de microglie dans ce modèle. D'ailleurs, aucun marqueur tel qu'IBA1 n'a été retrouvé dans nos structures. De la même façon, seules de faibles quantités d'oligodendrocytes ont été décrites dans ce modèle. De plus, les cellules endothéliales impliquées dans la vascularisation sont absentes ce qui exclut toute possibilité de vascularisation. Pour compenser cela, les organoïdes sont maintenus en culture sous agitation rotative afin de les oxygéner et d'apporter les nutriments du milieu de culture au centre des sphéroïdes.

Les protocoles actuels de génération d'organoïdes ne permettent pas de produire l'ensemble des types cellulaires impliqués dans le neurodéveloppement humain, mais ce modèle reste intéressant pour modéliser la complexité du cerveau humain (Qian *et al.*, 2017).

Un des défis importants a consisté à générer suffisamment de MB afin de tester différentes conditions d'infection. Dans nos expériences, moins de 10% des EBs générés deviennent des organoïdes et ont pu être inclus dans le protocole d'exposition à des souches de prions. En plus de sa complexité à mettre en place, cette technique est très coûteuse. Pour pallier à ce faible rendement, des optimisations sont en cours au sein de l'équipe afin de coupler le protocole de Lancaster à des molécules chimiques permettant aujourd'hui d'augmenter le rendement à près de 80% (travaux de thèse de Ferid Nassor, 2015-2018).

Les organoïdes cérébraux ne sont pas utilisables, pour l'heure, dans des études à grande échelle.

Ainsi, le modèle MB mime la complexité du neurodéveloppement humain grâce à la présence d'une diversité de cellules neurales en interaction les unes avec les autres et la compartimentalisation en différentes régions cérébrales. Toutefois, l'absence de cellules microgliales pourtant connues pour être impliquées dans les processus de neurodégénérescence souligne les limites de ce modèle pour mimer au plus près la complexité du SNC humain.

Modèle cellulaire murin

Dans nos conditions de culture, nous n'avons pas été en mesure d'extraire suffisamment de cellules viables issues de souris PrPKo (ZH1) pour permettre une reprogrammation cellulaire par le virus de Sendai. Pourtant, différents groupes ont réussi à obtenir des fibroblastes issus d'explant cutané de souris *Ngsk* PrPKo (Sato *et al.*, 1998 ; Prcina *et al.*, 2010). L'une des explications pourrait reposer sur l'utilisation de lignées murines différentes : *Ngsk* par rapport aux *ZH1*. Contrairement au modèle murin *ZH1*, les souris *Ngsk* ont été générées à partir d'une délétion large du gène *Prnp* conduisant à une surexpression de *Dpl* et des phénomènes d'ataxie (Moore *et al.*, 1999 ; Qin, O'Donnell, et Zhao, 2006). Cette différence de construction pourrait conduire à des modifications en termes de survie des fibroblastes *in vitro*. Une autre hypothèse pourrait être liée à nos conditions de dissociation cellulaire non adaptées aux souris *ZH1*. Nous avons utilisé une dissociation enzymatique à la collagénase avec une quantité très concentrée qui a permis d'extraire des fibroblastes pour les souris C57Bl/6 et Tg338 valident ainsi les conditions enzymatiques. Toutefois, l'absence de PrP^C pourrait influencer sur l'extraction de ces cellules associées à des techniques de culture non adaptées. Cette théorie pourrait potentiellement être liée au rôle de la PrP^C impliqué dans la prolifération, l'adhésion et la survie cellulaire. Il a été mis en évidence que son absence conduit à un stress oxydatif (Brown *et al.*, 1997) avec une implication dans les voies de l'apoptose Bax/ Bcl2 (Kim *et al.*, 2004).

Une des perspectives à court terme serait d'extraire des fibroblastes à partir d'autres lignées murines afin de déterminer si les conditions de culture choisies pourraient être utilisées dans ce cas.

Nous avons effectué la reprogrammation de fibroblastes issus de souris Tg338 (surexprimant la PrP^C ovine) grâce au virus de Sendai. Suite à cette reprogrammation, et malgré l'isolement et l'amplification de clones cellulaires, l'analyse en PCR de ces cellules n'a pas pu mettre en évidence les marqueurs endogènes de pluripotence attendus (*Sox2*, *Rex1* et *Nanog*). La formation de tératome n'a pas non plus permis de distinguer les trois feuillets embryonnaires : seul l'ectoderme a pu être mis en évidence. De façon surprenante ces cellules ont été maintenues pendant plusieurs passages sous forme de colonies avec des aspects morphologiques proches de ceux observés pour les cellules souches embryonnaires. Ces données pourraient être expliquées par un processus de reprogrammation partielle des cellules iPS (Yamanaka, 2009).

L'une des explications pourrait être liée au choix de la méthode de reprogrammation. Le virus de Sendai permet d'obtenir des taux de reprogrammation proches de ceux obtenus avec les vecteurs intégratifs (Fusaki *et al.*, 2009). Toutefois, cette technique est généralement utilisée pour reprogrammer des cellules somatiques humaines et non murines, ce qui pourrait en partie expliquer ces résultats.

Une autre explication pourrait être des conditions de culture non optimales. En effet, le milieu de culture des cellules souches pluripotentes murines doit être supplémenté quotidiennement en LIF, facteur limitant la différenciation et favorisant l'auto-renouvellement des cellules *in vitro* (Smith *et al.*, 1988). Contrairement au facteur FGF utilisé pour les cellules iPS humaines, le LIF n'est pas disponible sous une forme stabilisée. Concrètement, cela nous a conduit à ajouter des volumes de milieu de culture plus importants les week-ends. Cette contrainte favorisant la différenciation a pu conduire à la sélection et l'amplification de clones partiellement reprogrammés.

Il est également possible d'incriminer la technique de passage des cellules. Chaque semaine, les cellules iPS338 étaient dissociées manuellement. Cette technique pourtant connue pour garantir de meilleure condition de culture a pu conduire à la sélection d'un clone partiellement reprogrammé qui se serait amplifié au détriment des cellules iPS. En perspectives, il serait pertinent de coupler des techniques de dissociation enzymatique et manuel, c'est-à-dire retirer manuellement les colonies ne répondant pas aux critères requis (différenciation, bords non délimités) puis réaliser une dissociation enzymatique afin de sélectionner uniquement les cellules non différenciées. Cette technique avait été initiée mais ne permettait pas d'obtenir des colonies homogènes soulignant la nécessité d'adapter le protocole. La reprogrammation incomplète pourra éventuellement se corriger au cours des différents passages cellulaires comme cela a été souligné par différentes équipes (Kim *et al.*, 2010 ; Polo *et al.*, 2010). Pour cela, il serait nécessaire de rechercher la présence des différents marqueurs de pluripotence sur des cellules à passages plus tardifs.

Ainsi, les cellules iPS338 ont des capacités d'auto-renouvellement propres aux cellules souches embryonnaires (Rodolfa *et Eggan*, 2006). Toutefois, les marqueurs moléculaires et fonctionnels non pas été retrouvés et de la même façon le bioessai n'a pas permis une différenciation dans les trois feuillets primaires.

Organoïdes murins et simiens

Bien que les cellules murines iPS 338 aient potentiellement été partiellement reprogrammées, nous avons été en mesure de générer des EBs ainsi que des structures organoïdes présentant des marqueurs neuronaux (NeuN et Tuj1). Ces organoïdes murins ont été maintenus en culture plus de 150 jours après l'encapsulation en Matrigel soulignant la présence de précurseurs neuronaux. Nous pouvons noter l'absence d'organisation interne de ces structures ne permettant pas d'affirmer qu'elles soient des « Mini-Brains » c'est-à-dire des organoïdes cérébraux.

Les organoïdes simiens, quant à eux, présentent une organisation proche de celle observée dans les MBs humains (compartmentalisation, présence de rosettes neurales). Toutefois, des caractérisations approfondies à l'instar de celles réalisées sur les MBs humains (IHC, PCR, étude de fonctionnalité) sont encore nécessaires. Toutefois, à notre connaissance, c'est la première fois que des organoïdes neuro-ectodermiques ont été réalisés à partir de cellules iPS simiennes.

3.2 Caractérisation du modèle cellulaire après exposition prion

Plusieurs arguments peuvent être avancés en faveur de la capacité des organoïdes cérébraux à être sensibles aux souches humaines de prion. Tout d'abord, les cellules iPS d'origine humaines sont théoriquement sensibles aux souches utilisées. De plus, elles présentent un génotype MM au codon 129 tout comme les souches de prion humaines utilisées expérimentalement. L'autre élément crucial est l'expression de la PrP^C retrouvée à tous les stades du protocole de génération des organoïdes cérébraux : dans les cellules iPS, dans les EBs en plus faibles quantité, et dans les MBs associés à une augmentation de l'expression proportionnelle à leur différenciation. Enfin, les différentes études réalisées sur les neurosphères soulignent que les cellules peu différenciées et cultivées en 3D sont sensibles à l'infection (Giri *et al.*, 2006 ; Milhavet *et al.*, 2006b ; Herva *et al.*, 2010 ; Iwamaru *et al.*, 2013 ; Relaño-Ginés, Lehmann, et Crozet, 2014). De plus, ces structures neuro-ectodermiques présentent une population cellulaire variée (astrocytes, neurones et oligodendrocytes) mimant la complexité du cerveau et offrant ainsi des interactions cellules-cellules.

Plusieurs stratégies d'exposition à des souches de prions

Notre première stratégie d'infection a reposé sur une exposition chronique des organoïdes humains avec l'ajout de l'infectiosité directement dans le Matrigel (matrice servant de support aux MBs). Grâce aux bioessais, nous avons été en mesure de mettre en évidence une augmentation de l'infectiosité par rapport à la charge initiale d'exposition. En parallèle, les analyses en RT-QuIC ont confirmé que 60 jpe des phénomènes d'agrégation sont retrouvés de façon plus importante que dans les MBs exposés moins longtemps. Ces résultats sont très encourageants et suggèrent que les organoïdes neuro-ectodermiques sont pertinents comme modèle d'infection par des souches de prions. Toutefois, une faible augmentation de l'infectiosité a été retrouvée, ce qui laisse sous-entendre que des optimisations sont nécessaires.

Une seconde stratégie d'exposition dite « aiguë » a été réalisée. Cette fois-ci nous avons exposé les organoïdes à un stade de différenciation plus tardif où le Matrigel n'est plus présent. Ces conditions permettent à l'infectiosité de ne pas être « piégée » dans le Matrigel et de mimer au plus près les modes de contaminations naturels. Cette deuxième stratégie a également été optimisée en exposant les organoïdes en présence de billes de 300 nm (Ademtech). Nous avons émis l'hypothèse que dans la mesure où la PrP anormale est capable de s'adsorber sur les billes, cela pourrait augmenter artificiellement le titre infectieux. De plus, il est possible que les billes puissent induire un noyau de nucléation favorisant l'agrégation des formes infectieuses et ainsi l'infection.

En RT-QuIC, une persistance des phénomènes d'agrégation est observée dans les MBs récoltés 60 jours post-exposition. Ces phénomènes d'agrégation sont diminués par rapport aux MBs exposés à la charge initiale suggérant que cette stratégie d'exposition est moins efficace que l'exposition chronique dans le Matrigel. L'une des explications pourraient être que le temps de mise en contact entre l'infectiosité et les organoïdes est trop court (2 heures), nécessitant donc des adaptations du protocole.

Enfin, une autre stratégie d'exposition a été initiée cette fois-ci directement sur les cellules iPS humaines et murines (iPS 338). Concrètement, ces cellules ont été exposées à différentes souches de prions (MCJ et TAC respectivement) avant de générer des organoïdes. Les premières données reposant sur l'aspect macroscopique soulignent que l'ajout de l'homogénat directement sur les cellules iPS est toxique pour celles-ci, de même que la croissance des EBs est ralentie. En raison de l'extrême sensibilité des cellules iPS aux conditions de culture, une adaptation du protocole est nécessaire pour développer cette nouvelle technique d'exposition.

Différentes perspectives possibles

Différentes perspectives ont rapidement été envisagées, mais face à la difficulté d'obtenir un nombre suffisant d'organoïdes, elles n'ont pu être réalisées.

Concernant la stratégie d'exposition aiguë, différents temps de mise en contact entre l'inoculum et les organoïdes auraient pu être testés. Dans notre étude, l'inoculum a été mis en contact pendant 2 heures avec les organoïdes. Par ailleurs, des tests devront être faits afin de confirmer ou d'invalider l'intérêt des billes dans cette stratégie d'exposition. Plus précisément à partir du même protocole, seules les billes pourraient être mises en contact avec le MB et inversement seul l'homogénat sans les billes. Cela implique que nous disposions d'une technique de détection rapide, autre que *l'in vivo* s'avérant trop longue et peu envisageable éthiquement car nécessitant un grand nombre d'animaux. Les méthodes d'amplification telle que la RT-QuIC apportent ainsi une solution pertinente. En parallèle, une augmentation de la quantité d'infectiosité pourrait être envisagée permettant une détection potentielle de PrP^{res} en WB. On peut également citer des expositions répétées telles que l'utilisation de milieux conditionnés c'est-à-dire le recyclage de la moitié du milieu de culture afin d'augmenter la charge infectieuse artificiellement. Toutefois, il est important de garder en mémoire que l'intégrité des sphéroïdes doit être conservée.

Il serait également possible de tirer avantage de la technologie des organoïdes cérébraux pour évaluer les effets cytotoxiques d'une exposition à des prions. Nos résultats préliminaires soulignent une augmentation des cellules apoptotiques (technique TUNEL) dans les MBs exposés par rapport aux MBs contrôles. Ces résultats devront être confirmés avec d'autres techniques et sur l'ensemble des MBs exposés (différents jpe, stratégie d'exposition aiguë). De plus, il est important d'aller plus loin et de déterminer quel type cellulaire est impliqué dans la mort cellulaire (neurones, astrocytes, ou cellules indifférenciées). En effet, une fois que les techniques IHC de détection de la PrP anormale seront optimisés, il serait pertinent de déterminer où cette dernière s'accumule (région exprimant des marqueurs particuliers) et dans quel type cellulaire.

Les cellules iPS offrent la possibilité de pouvoir travailler *in vitro* sur des modèles cellulaires humains à partir de cellules somatiques de patient. À ce jour, une seule équipe a généré des cellules iPS provenant d'un patient atteint de GSS ([Matamoros-Angles et al., 2017](#)). Aucune accumulation anormale de PrP n'a été retrouvée ni de PrP^{res} néoformée suite à l'exposition de souches de prions murines et humaines. Il est possible que ces cellules iPS humaines soient plus sensibles à une exposition prion sous forme d'organoïdes cérébraux dans nos conditions de culture.

Très récemment, une équipe a obtenu des résultats prometteurs grâce à la différenciation en astrocytes de cellules iPS humaines ([Krejciova et al., 2017](#)). Après différents passages, un maintien de la PrP^{res} a été observé dans ces astrocytes humains exposés à l'agent de la vMCJ.

Cette étude souligne le potentiel important que représente les cellules iPS dans la modélisation des maladies à prions et à plus large échelle des maladies neurodégénératives.

Pour la première fois, il a été mis au point un modèle cellulaire utilisant des astrocytes humains sensibles à une souche de prions humaines. L'implication des astrocytes dans les maladies à prions avaient déjà été soulignée dans les neurosphères (Iwamaru *et al.*, 2013) et dans d'autres modèles *in vitro* (Aguzzi et Liu, 2017). Dans des expériences futures, nous souhaiterions également déterminer de façon plus précise quel type cellulaire est responsable de la propagation de l'agent dans les organoïdes humains exposés à une souche sporadique de MCJ.

3.3 Les limites des organoïdes cérébraux comme modèle d'infection

Il est possible de s'interroger sur la pertinence d'utiliser des organoïdes cérébraux mimant le neurodéveloppement humain pour modéliser des pathologies affectant principalement des individus adultes. Une des alternatives étudiées au sein du laboratoire repose sur l'induction d'un vieillissement accéléré des cellules iPS. Récemment, il a été proposé la surexpression du gène de la progérine dans les cellules iPS afin de récapituler la physiopathologie de la maladie de Parkinson (Miller *et al.*, 2013). Précisons, toutefois, que plusieurs cas pédiatriques ont été décrits dans les maladies à prions (Verity *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que les cellules indifférenciées sont sensibles à l'infection prion au travers des neurosphères, ou des cellules souches neurales issues des zones de neurogenèses adultes.

Nos résultats soulignent la difficulté à distinguer la PrP anormale néoformée de celle initialement ajoutée au cours de l'exposition. En effet, nous avons été dans l'impossibilité d'utiliser des techniques de détection dites « classiques » c'est-à-dire plus simples à mettre en œuvre au sein d'un laboratoire et alternatives à l'expérimentation animale. Nos protocoles optimisés d'immunohistochimie sur des organes simiens, murins voire humains ne nous ont pas permis de distinguer la PrP^C endogène des MBs de la PrP anormale ajoutée. Cette contrainte technique a également été retrouvée en WB. Nous avons réussi à déterminer la dose de PK permettant d'éliminer la PrP^C endogène toutefois dans ces conditions aucune PrP^{res} n'a été retrouvée dans les MBs. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence de détection par des techniques biochimiques : (i) absence de répllication de l'infectiosité dans les MBs contredite par les données *in vivo* (ii) limite du seuil de détection (iii) modification de la souche.

L'hypothèse de la limite du seuil de détection peut être expliquée dans la mesure où nous avons ajouté de faibles quantités de charge infectieuse afin de limiter la toxicité cellulaire dans les MBs. La théorie de la modification de la souche peut être expliquée par l'exposition des MBs humains avec des souches de prions issues de macaques. De plus, il faut noter que les MBs ont été cultivés dans un milieu de culture enrichi en antibiotiques décrits pour avoir un rôle d'agent agrégeant la PrP (Bencsik *et al.*, 2006). Dans notre étude, les antibiotiques ont été retirés du milieu de culture deux semaines après l'exposition (chronique et aiguë) des organoïdes.

Un autre élément à prendre en compte est la variabilité inhérente du modèle : chaque organoïde neuroectodermique généré est unique en termes d'organisation et de répartition entre les types cellulaires. Cet élément peut être vu comme un frein car les données obtenues doivent être confirmées par des réplicats, d'autant que nos protocoles de génération offrent peu de rendement.

Mise en place d'un modèle organoïde d'infection en 3D (étude B)

Toutefois, cet élément est également un avantage car il mime la complexité des cas retrouvés chez l'Homme.

En conclusion, les cellules iPS offrent de nouvelles perspectives afin de travailler sur une quantité théoriquement illimitée de cellules humaines. Dans nos conditions de culture, nous avons réussi à observer une réplication efficace d'au moins un isolat de souche sporadique de MCJ dans les MBs humains. Ces résultats encourageants pourraient, une fois le modèle caractérisé et optimisé, permettre de vérifier sur un modèle humain l'efficacité préclinique de molécules thérapeutiques contre la maladie de Creutzfeldt-Jakob. De plus, pour la première fois, nous avons décliné ce modèle sur des cellules simiennes et murines offrant, à plus long terme, une alternative à l'expérimentation animale.

Discussion générale

La publication par l'équipe de Gill en 2013 d'un nombre anormalement élevé d'appendices de patients britanniques avec un marquage détectable de PrP anormale avait confirmé le risque d'avoir des porteurs asymptomatiques beaucoup plus nombreux que les cas cliniques détectés jusqu'alors (Gill *et al.*, 2013). Elle suggérait également qu'après exposition à l'agent de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) plus de 99% des contaminations pourraient demeurer cliniquement silencieuses avec donc un risque de transmission secondaire par transfusion sanguine. Notre approche expérimentale dans les modèles simien et murin avait pour but d'appréhender ce risque transfusionnel notamment au travers de l'étude de la réplication périphérique de ces agents dans les tissus lymphoïdes et de la détection de la PrP anormale dans les follicules. Il a été estimé que la population française (deuxième pays comptabilisant le plus important nombre de patients) aurait été dix fois moins exposée que la population britannique (Clarke et Ghani, 2005). En France, l'incidence de porteurs silencieux pourrait donc être de 1/20 000. La forte prévalence de porteur asymptomatique est d'autant plus problématique dans la mesure où les phases précliniques peuvent être longues au regard de l'espérance de vie (Collinge *et al.*, 2006 ; Collinge *et al.*, 2008). Les porteurs asymptomatiques pourraient ainsi constituer un réservoir pour les contaminations secondaires inter-humaines.

La forme classique de vMCJ attendue est présente dans une partie des macaques transfusés

L'évaluation expérimentale du risque transfusionnel dans le modèle du macaque cynomolgus a permis de mettre en évidence les deux groupes de receveurs déjà décrits chez l'Homme : les individus développant une vMCJ (Llewelyn *et al.*, 2004 ; Wroe *et al.*, 2006 ; www.hpa.org.uk) et ceux asymptomatiques (Peden *et al.*, 2004 ; Peden *et al.*, 2010).

Les macaques transfusés développant une vMCJ présentent l'ensemble des caractéristiques des maladies à prions en termes de : symptomatologie, triade lésionnelle (spongiose, gliose et perte neuronale) et accumulation de PrP^{res} dans le cerveau ainsi que dans les organes lymphoïdes. Ces résultats soulignent une fois de plus la pertinence de ce modèle dans l'étude de la physiopathologie des maladies à prions humaines (Lasmèzas *et al.*, 1996 ; Herzog *et al.*, 2004 ; Ritchie *et al.*, 2016, McDowell *et al.*, 2015).

Une très grande hétérogénéité a été retrouvée dans la répartition de la PrP anormale en fonction des animaux et chez un même animal en fonction des tissus lymphoïdes. Dans nos modèles mimant les transfusions sanguines chez l'Homme, en l'absence de doses infectantes massives saturant tous les sites de réplication, de très grandes variations sont retrouvées en fonction notamment des ganglions lymphatiques étudiés. Au cours de cette étude, plus de 10 000 follicules lymphoïdes ont été examinés ne soulignant pas de distribution préférentielle évidente de la PrP anormale en fonction de la localisation des ganglions. L'exemple le plus frappant a été observé sur le quadruplet de macaques transfusés le même jour avec le même inoculum qui ont tous développé une vMCJ entre 29 et 33 mois : la positivité des ganglions lymphatiques testés variait de 100% (avec une variation de 8 à 85% des follicules positifs en fonction des ganglions et une moyenne d'environ 30%) pour l'un des animaux à seulement 20% pour l'autre extrême (avec une variation de un follicule

jusqu'à 60% des follicules positifs et une moyenne de moins de 10% pour les ganglions positifs). L'ensemble de ces observations implique que sur la base de l'étude d'un seul tissu lymphoïde, il existe une forte probabilité d'obtenir des résultats faussement négatifs. Ces résultats peuvent être rapprochés des observations rapportant la difficulté de détecter un marquage de PrP anormale dans les tissus lymphoïdes de certains patients ayant pourtant des formes cliniques avérées de vMCJ (Joiner *et al.*, 2005 ; Brandel *et al.*, 2009). Nos résultats fournissent ainsi pour la première fois des données expérimentales comparatives non biaisées (par rapport à la situation humaine où seuls les cas positifs peuvent être pris en compte) qui permettent d'étayer la suspicion de sous-évaluation de la prévalence des porteurs de vMCJ apparemment sains tels qu'évaluée par l'équipe de Gill et ses collaborateurs (Gill *et al.*, 2013).

La détection de PrP anormale amplifiable dans le sang ainsi que la probabilité de transmission de la maladie par transfusion apparaissent globalement proportionnelles au niveau de contamination des tissus lymphoïdes. En d'autres termes, et de manière logique par rapport aux schémas physiopathologiques couramment proposés, le nombre de follicules lymphoïdes positifs pour la détection de PrP anormale semble conditionner l'infectiosité circulante dans le sang et donc la capacité des techniques d'amplification de type PMCA à détecter une positivité dans les globules blancs (*buffy coat*). De la même manière, le niveau de positivité des tissus lymphoïdes et du sang est prédictif de la capacité à transmettre la maladie par transfusion. Cela signifie également qu'en dessous du seuil de détection de la PMCA telle que pratiquée sur ces échantillons, le risque transfusionnel devient beaucoup plus faible, donnée qui souligne une grande importance en termes de santé publique sous réserve des correspondances avec la situation humaine.

Par ailleurs un troisième groupe d'animaux a été identifié : les individus développant un syndrome myélopathique

Les macaques transfusés avec l'agent de la vMCJ déclarant un syndrome myélopathique ne présentent pas les critères classiquement décrits dans les maladies à prions (Lescoutra-Etcheagaray *et al.*, 2015 ; Comoy *et al.*, 2017). Des différences importantes sont observées tant au niveau des signes cliniques (atteinte principalement des membres supérieurs) que des lésions observées *post-mortem* (pseudo-nécrose des cornes antérieures de la moelle épinière cervicale). L'analyse biochimique n'a pas permis de mettre en évidence de PrP^{res} (WB, ELISA) ni même de dépôts anormaux cérébraux de PrP en immunohistochimie. En revanche, des résultats préliminaires tendent à mettre en évidence des phénomènes d'agrégation en PMCA dans le sang de certains macaques transfusés (*résultats non montrés et en cours de confirmation*). Ces données soulignent le risque en termes de santé publique si ce syndrome existe réellement chez l'Homme car il ne serait pas diagnostiqué comme une maladie à prions.

Le syndrome myélopathique correspond à une maladie à prions. Le premier argument repose sur l'optimisation de nos protocoles de détection de la PrP anormale en immunohistochimie. En effet, nous avons réussi à détecter chez les macaques myélopathiques des dépôts anormaux de PrP dans la rate, situés spécifiquement autour des vaisseaux. Concernant les macaques transfusés développant une vMCJ, les mêmes accumulations ont été retrouvées en plus de celles classiquement observées axées dans les structures immunitaires de la pulpe blanche. Le second argument a été obtenu suite à une série de transmission *in vivo* d'homogénats cérébraux et de dérivés sanguins. Nous avons mis en évidence que le syndrome myélopathique est transmissible (une des caractéristiques majeures des

ESTs) aux macaques et sous forme de phénotypes incomplets de vMCJ aux souris conventionnelles (modèle Swiss) (Comoy *et al.*, 2017). Les phénotypes observés chez les souris exposées sont caractérisés par une accumulation ou non de PrP^{res} dans le cerveau et/ ou la moelle épinière associée ou non à une spongiose dans les mêmes organes.

Ainsi, ces formes atypiques décrites chez les souris présentent une partie des caractéristiques des maladies à prions (spongiose ou PrP^{res}). Mais surtout ces résultats *in vivo* confirment bien l'appartenance du syndrome myélopathique dans le large spectre des maladies à prions.

Des formes atypiques de maladies à prions ont déjà été décrites dans la littérature.

Chez l'animal, les formes atypiques de tremblante ou d'ESB ont été décrites très tardivement et de façon fortuite grâce à de nouvelles techniques de dépistage (Tranulis *et al.*, 1999 ; Casalone *et al.*, 2004 ; Biacabe *et al.*, 2004). En effet, ces pathologies diffèrent d'un point de vue clinique, biochimique et épidémiologique par rapport aux formes dites classiques, et étaient passées inaperçues pendant de nombreuses années.

Cette théorie est également cohérente chez l'Homme avec la découverte ces dernières années de nouvelles maladies telles que les VPSPr (Gambetti *et al.*, 2008 ; Zou *et al.*, 2010 ; Head *et al.*, 2013) ou encore de nouvelles formes familiales (Mead *et al.*, 2013). Décrite en 2013, cette dernière forme familiale est tout à fait intéressante car elle souligne l'apparition de signes cliniques liés à une atteinte du SN périphérique avant même ceux associés à l'atteinte centrale irréversible (Mead *et al.*, 2013). Une autre étude souligne l'apparition de nouveaux symptômes centrés sur la moelle épinière dans les formes sporadiques de MCJ (Azevedo *et al.*, 2001). Ainsi, la possibilité de voir apparaître de nouvelles maladies à prions associées à des signes cliniques non conventionnels est pertinente avec les données issues de la littérature. La résistance variable à la protéolyse des VPSPr souligne un autre élément crucial : la présence de différentes conformations anormales de la PrP (Gambetti *et al.*, 2008 ; Zou *et al.*, 2010). En 2013, Kovacs et son équipe iront plus loin en décrivant une nouvelle maladie à prion sans PrP^{res} détectable (Kovacs *et al.*, 2013). Leurs travaux présentent six patients avec une atteinte thalamique associée à une démence rapide et progressive. L'analyse neuropathologique révèle uniquement des dépôts anormaux de PrP dans les régions corticales. Ces auteurs n'excluent pas la possibilité qu'une forme de PrP^{res} soit présente mais en quantité trop faible pour être détectée ou que cette isoforme pathologique soit localisée dans des régions cérébrales non analysées (Kovacs *et al.*, 2013).

Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'en parallèle des formes « classiques » de maladies à prions il existe tout un spectre de maladies qui restent à caractériser et dont les schémas pathogéniques ne sont pas clairement élucidés.

De façon plus générale, il est également important de discuter de la place de la PrP^{res} comme seule caractéristique des ESTs. Actuellement, sa présence est considérée comme le marqueur biologique dominant et primordial dans les maladies à prions. Pourtant, avant que la PrP ne soit considérée comme l'agent causal des ESTs, d'autres critères neuropathologiques prédominaient tels que la spongiose, la gliose et la perte neuronale. De plus, la VPSPr vient contredire ces données en laissant la place à d'autres formes intermédiaires regroupées sous le terme de PrP^{sen} (Gambetti *et al.*, 2008 ; Zou *et al.*, 2010). Deux raisons principales peuvent expliquer la perte de résistance de la PrP à la PK (si l'on part du principe qu'il y a une perte de résistance à la protéolyse et non une absence de PrP^{res}). La première pourrait être liée directement à une modification de la souche associée à la grande

variabilité du domaine Nter suggérant une diversité de conformation et d'agrégation. La seconde possibilité est que certaines formes de maladie à prions ne présentent aucune accumulation de PrP^{res}. En effet, différentes études ont souligné la dissociation entre la résistance à la protéolyse de la PrP et la présence d'infectiosité (Collinge *et al.*, 1995 ; Lasmézas *et al.*, 1997 ; Tixador *et al.*, 2010 ; Kaatz *et al.*, 2012 ; Lewis *et al.*, 2012 ; Laferrière *et al.*, 2013).

Ainsi, une absence de détection de PrP^{res} ne suggère pas une absence d'infectiosité et n'exclue pas que ces maladies ne soient pas une EST. La présence de maladie à prions sans PrP^{res} a déjà été observée dans plusieurs études chez l'animal (Lasmézas *et al.*, 1997 ; Flechsig *et al.*, 2001). Chez l'Homme, des patients présentant peu de PrP^{res} ont également été identifiés (Brandel *et al.*, 2009). Enfin, une autre hypothèse, cette fois-ci technique, permettrait d'expliquer la faible quantité de PrP^{res} détectée voire son absence de détection. En effet, il est tout à fait envisageable que nous soyons en dessous du seuil de détection avec les techniques actuelles ou surtout qu'il soit impossible de distinguer la PrP^C de son isoforme anormale. Dans ce sens, différents auteurs ont rapporté la possibilité d'avoir des interférences directes avec l'enzyme utilisée en l'occurrence la protéinase K (Dudas *et al.*, 2015). Face aux nouvelles pathologies décrites présentant peu voire pas de PrP^{res} détectable il serait pertinent de redéfinir les critères actuels des maladies à prions (Gambetti *et al.*, 2008 ; Mead *et al.*, 2013 ; Kovacs *et al.*, 2013).

Le dernier élément plausible permettant d'expliquer l'apparition du syndrome myélopathique chez les macaques transfusés pourrait être directement lié au mode d'exposition à l'agent

Le syndrome myélopathique semble être associé au mode d'exposition à l'agent de la vMCJ

Chez les macaques transfusés développant une myélopathie, une absence de réplication périphérique classique de la PrP anormale est décrite à l'exception de celle retrouvée chez trois macaques sur les 10 testés (soit un total de 30%). Pourtant un grand nombre d'études vont dans le sens de l'importance d'une accumulation de PrP anormale dans les tissus lymphoïdes (associée à l'expression cellulaire de la PrP^C) afin d'avoir une neuroinvasion efficace suite à une exposition périphérique (Fraser et Dickinson, 1970 ; Prinz *et al.*, 2003 ; Beringue *et al.*, 2008). Face à l'absence de réplication classique périphérique cela conduirait à une neuroinvasion inefficace ou différente telle qu'une atteinte préférentielle de la moelle épinière. Dans la mesure où l'accumulation de PrP anormale chez les macaques myélopathiques est retrouvée dans les régions périvasculaires spléniques, une des hypothèses est qu'une seule voie de dissémination de l'infectiosité existe et qu'elle conduise préférentiellement à des atteintes médullaires et bulbaires. Il a par exemple été montré chez la souris qu'après une exposition par voie péritonéale, l'infectiosité s'accumulait dans un premier temps au niveau de la moelle épinière thoracique, puis se disséminait dans l'ensemble de la moelle épinière pour enfin atteindre le cerveau (Kimberlin et Walker, 1982 ; Kimberlin et Walker, 1988). Ainsi, il est envisageable que l'atteinte soit trop précoce à la vue de l'espérance de vie de l'animal, c'est-à-dire que la dissémination n'ait pas eu le temps d'aller jusqu'au cerveau. Toutefois, cette hypothèse semble peu probable dans la mesure où les macaques myélopathiques ont présenté une période d'incubation équivalente à celle décrite chez les macaques transfusés développant une vMCJ voire même une transmission plus rapide (Lescoutra-Etcheagaray *et al.*, 2015 ; Comoy *et al.*, 2017).

En parallèle, un autre argument pourrait conforter le fait que la voie d'inoculation favorise l'expression du phénotype atypique observé chez les macaques transfusés avec l'agent de la vMCJ. Il repose sur une série de prétraitements particuliers afin d'optimiser les protocoles d'immunohistochimie actuels de détection des épitopes de la PrP. En effet, nous avons réussi à détecter une accumulation anormale de PrP autour des vaisseaux spléniques chez les macaques transfusés myélopathiques. Ces immunomarquages sont également retrouvés chez nos animaux développant des formes classiques de vMCJ en plus des marquages folliculaires habituels. Ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse que la réplication périphérique, étape précoce et vraisemblablement clé dans la neuroinvasion, pouvait reposer sur un deuxième mécanisme jusqu'alors inconnu.

Le syndrome myélopathique est transmissible en l'absence de système immunitaire fonctionnel contrairement à la forme classique de vMCJ inoculée par voie intra-veineuse.

Afin de déterminer si la rate est toutefois l'organe supportant la réplication périphérique pour les macaques myélopathiques, nous avons procédé à des inoculations dans un modèle murin immunodéficient. Nous avons utilisé comme contrôle la forme classique de vMCJ. Nos expériences confirment que la forme classique de vMCJ, en l'absence de centres germinatifs fonctionnels, n'a pas de réplication périphérique efficace et donc ne se transmet pas.

À l'inverse, nos résultats démontrent, qu'après inoculation intraveineuse, la réplication des souches myélopathiques est efficace en absence d'un système immunitaire fonctionnel. Ces données ne permettent pas d'exclure la possibilité que la rate soit le lieu de la réplication périphérique ou qu'inversement un autre organe soit impliqué. En effet, il est possible qu'en raison du caractère immunodéficient des souris NSG, la réplication n'est pu être efficace. Afin de déterminer si la rate est le support d'une réplication périphérique lors d'une exposition par voie intraveineuse, nous avons initié une série de passages secondaires à des souris conventionnelles en utilisant les rates des souris immunodéficientes exposées comme inocula (*souris actuellement en cours d'incubation*).

Nos données soulignent également que les souches myélopathiques sont capables de transmettre un phénotype atypique chez ces souris. Ces résultats confirment ceux apportés dans d'autres modèles murins conventionnels ([Comoy et al., 2017](#)).

Ainsi, la capacité des souches myélopathiques à transmettre des phénotypes atypiques dans un modèle murin immunodéficient, souligne des schémas pathogéniques différents de ceux connus pour l'agent de la vMCJ. Toutefois, une question fondamentale reste non résolue dans notre étude et concerne le support, s'il existe, de la réplication périphérique de ces souches atypiques induites par l'exposition de l'agent de la vMCJ par voie intraveineuse.

En conclusion, le syndrome myélopathique a pu être sélectionné par l'utilisation de la voie intraveineuse plutôt que des voies orales et intracérébrales, habituellement utilisées dans le modèle du macaque cynomolgus. De plus, nous pouvons également nous demander si le syndrome myélopathique n'aurait pas pu être sélectionné par l'utilisation de dérivés sanguins plutôt que de cerveaux infectés au stade terminal. Cette hypothèse a déjà été présentée dans la dernière publication du laboratoire ([Comoy et al., 2017](#)). L'idée pourrait être que l'inoculation de dérivés sanguins avec des formes infectieuses solubles conduise à des formes myélopathiques tandis que celle d'homogénats cérébraux avec des agrégats à une vMCJ. Ces données sont sous-tendues par la possibilité que les structures périvasculaires accumulent la PrP anormale chez les macaques

transfusés (vMCJ et myélopathiques) jouent un rôle de filtre en fonction de l'infectiosité inoculée : soluble lors d'inoculation de dérivés sanguins ou agrégée lors d'homogénats cérébraux. Nos caractérisations immunohistochimiques soulignent que cette structure parenchymateuse est composée de fibres et de collagène.

Existe-t-il un nombre plus important de porteurs asymptomatiques que celui annoncé dans les études de prévalence de Gill *et al.*, 2013 ?

Les études de prévalence ont été conduites sur des cohortes de patients britanniques (Hilton *et al.*, 2004 ; Frosh *et al.*, 2004 ; Clewley *et al.*, 2009 ; De Marco *et al.*, 2010 ; Gill *et al.*, 2013 ; Diack *et al.*, 2017). À ce jour, aucune étude n'a été menée sur la population française. Dernièrement, la validation de l'analyse du LCR par PMCA pourrait, lors de son automatiser, permettre de réaliser des études de prévalence notamment en France grâce à cette méthode d'amplification (Bougard *et al.*, 2016). Si on estime que la population française a été 10 fois moins exposée que la population britannique, il faudrait donc tester plus de 300 000 pièces post-opératoires pour pouvoir espérer retrouver des échantillons positifs tout comme dans l'étude de Gill et ses collaborateurs (Gill *et al.*, 2013). Si une telle étude devait être entreprise, elle nécessiterait de disposer de technique de détection dans le sang moins contraignante que la PMCA pour être en mesure de traiter un tel nombre d'échantillons.

Les études de prévalence présentent deux principales limites qui sont importantes de soulever. La première est qu'il est impossible de déterminer le devenir des porteurs asymptomatiques et donc de savoir s'ils développeront ou non la maladie au regard de la longue phase préclinique. De même, aucune donnée ne permet de déterminer si le sang de ces patients cliniquement silencieux est réellement infectieux et pourrait conduire à une transmission secondaire de l'agent.

La seconde limite est que la prévalence de porteurs asymptomatique puisse être plus importante que 1/2000. En effet, plusieurs études soulignent la présence de patients vMCJ présentant peu voire pas de réplication périphérique détectable (Joiner *et al.*, 2005 ; Brandel *et al.*, 2009 ; Mok *et al.*, 2017). De même, ces études sont réalisées sur des pièces d'amygdales ou d'appendices autres que la rate qui est connue pour accumuler de façon plus importante l'infectiosité. Cette dernière limite suggère que les dépôts anormaux de PrP observés dans les pièces d'appendices ne seraient qu'une partie de ceux réellement présents dans les autres tissus lymphatiques telle que la rate.

Dans notre étude, lorsque nous étudions la réplication anormale dans les ganglions lymphatiques, nous observons une grande hétérogénéité entre les macaques transfusés. Sur un total de 17 macaques vMCJ testés, un animal n'avait aucun follicule accumulant de la PrP anormale dans les ganglions lymphatiques ainsi que dans la rate. De plus, cinq autres animaux présentaient moins de 50% des follicules positifs. Ces données confirment qu'il est primordial d'analyser un grand nombre de follicules afin d'en trouver un positif. Cet élément crucial avait déjà été souligné dans l'étude précédente (Gill *et al.*, 2013).

En conclusion, cette grande hétérogénéité d'accumulation périphérique dans les ganglions lymphatiques chez les macaques transfusés (classiques et myélopathiques) sous-entend que les études de prévalence basées sur l'analyse d'organes lymphoïdes puissent être sous-estimées et individualisent insuffisamment le nombre de porteurs asymptomatiques et donc le risque pour la population. De plus, les différentes études de prévalence ont révélé que les dépôts anormaux de PrP étaient majoritairement retrouvés dans l'appendice par rapport aux amygdales. Cette hétérogénéité entre les organes lymphatiques a également été observée dans notre étude. Nous avons analysé des

ganglions lymphatiques répartis dans l'ensemble de l'organisme. Nos résultats mériteraient d'être repris et analysés de façon statistique mais soulignent une accumulation de PrP dans les ganglions situés à proximité immédiate du SNC et dans les ganglions mésentériques chez les macaques transfusés vMCJ.

La possibilité d'avoir des phénotypes atypiques transmissibles en dehors des critères de diagnostic.

Chez les macaques transfusés le même phénomène de porteurs asymptomatiques est retrouvé suite à des actes transfusionnels expérimentaux de l'agent de la vMCJ. Sur les 50 macaques transfusés expérimentalement au sein du laboratoire avec des agents infectieux, 27 d'entre eux ont présenté des signes cliniques, soit 54%. Les 23 autres macaques transfusés sont asymptomatiques ce qui représente 46% des individus soit 920 individus porteurs potentiels sur 2000, soulignant un nombre plus important de porteurs asymptomatiques. Ces résultats sont accentués par le nombre conséquent de macaques développant le syndrome myélopathique (10/27 macaques totaux présentant des signes cliniques) qui ne seraient pas pour l'heure diagnostiqués comme une maladie à prions. Si on considère, qu'au regard des critères de diagnostic actuels, ces macaques entrent dans la catégorie des porteurs asymptomatiques : la prévalence serait de 1320/ 2000. Ces résultats sont bien évidemment à nuancer dans la mesure où nos données ne permettent pas d'affirmer que le syndrome myélopathique soit présent chez l'Homme.

Si une telle expression de cette forme existe chez l'Homme, elle ne serait donc pas diagnostiquée comme une maladie à prion mais comme une autre entité pathologique. Toutefois, le caractère transmissible de ces formes amène tout un questionnement sur le risque en termes de santé publique. Nos données ne permettent pas d'exclure ni d'affirmer que le syndrome myélopathique puisse être décrit chez l'Homme. Les caractérisations approfondies des structures spléniques nous ont permis de valider que les structures périvasculaires accumulant de la PrP anormale chez les macaques transfusés étaient également présentes chez l'Homme. Pour évaluer le risque zoonotique potentiel, différents passages dans des souris humanisées ont été réalisés. Pour l'heure, la majorité des animaux est encore en cours d'incubation. Toutefois, ces résultats nécessiteront sans doute, comme nous l'avons vu tout au long de ce travail, d'analyser un grand nombre d'animaux afin de mettre en évidence des différences : chez les souris Swiss 6% présentaient des phénotypes atypiques (n = 417) et 7% chez les souris immunodéficientes, NSG (n = 149).

La possibilité que le syndrome myélopathique soit uniquement retrouvé chez les macaques est également envisageable et limiterait le risque en termes de santé publique.

Il est connu qu'il existe une forte homologie de séquence entre la PrP^C humaine et simienne (Schatz *et al.*, 1995). Toutefois, si le syndrome myélopathique est une maladie simienne, son adaptation à ce modèle et à celui de la souris nécessitera un temps d'adaptation de la souche. Différents passages de retransmission sont en cours afin d'évaluer le phénomène d'adaptation de souches bien décrits chez la souris (Lasmézas *et al.*, 1997). Cette hypothèse est à nuancer dans la mesure où le syndrome myélopathique conduit au développement de phénotypes atypiques chez des souris conventionnelles et immunodéficientes. Ainsi, la prévalence de porteurs asymptomatiques plus importante que prévue permet de craindre l'apparition d'un plus grand nombre de cas de contamination secondaire par la vMCJ que les trois observés jusque-là. De plus, si comme dans le modèle du macaque cynomolgus, il existait chez l'homme des formes de maladie à prions à symptomatologie et tableau lésionnel différents de la vMCJ ne présentant pas d'accumulation de PrP^{res} dans le SNC, le nombre de cas humains contaminés par transfusion sanguine pourrait alors être sous diagnostiqué de manière massive. Une de nos perspectives à long terme est d'être en mesure de diagnostiquer ce phénotype et donc de trouver

une technique IHC utilisable sur d'autres organes lymphoïdes classiquement utilisés chez l'Homme dans les études de prévalence.

Les méthodes de détection de l'agent

À défaut d'une élimination complète de l'agent contenu dans le sang, la sécurisation des actes transfusionnels passe par la détection de l'agent lors des dons de sang. Expérimentalement, quelle que soit la méthode de détection utilisée, il convient de distinguer d'une part la PrP^C de son isoforme anormale et d'autre part la PrP^{res} néoformée de celle initialement inoculée. En effet, il n'existe pas d'anticorps spécifique de la forme anormale, ce qui conduit à « jouer » sur les propriétés particulières de la PrP anormale notamment sa résistance à la PK. Il est donc nécessaire de trouver des techniques de démasquage des épitopes drastiques pour éliminer la PrP^C mais non destructives de son isoforme anormale. Au laboratoire une des thématiques repose sur l'optimisation des protocoles de démasquage des épitopes à l'aide de prétraitements successifs.

Les techniques d'immunohistochimies

Dans notre étude, l'évaluation expérimentale du risque transfusionnel, nous a conduit d'une part à caractériser les souches myélopathiques dans un modèle murin immunodéficient et à mettre en place d'autre part un modèle cellulaire d'infection cultivé en 3D.

La difficulté rencontrée dans ces deux axes de recherches a été d'être en mesure de différencier la PrP anormale de son isoforme physiologique dans : (i) les macaques myélopathiques (ii) les souris immunodéficientes présentant des phénotypes atypiques et enfin (iii) les organoïdes neuro-ectodermiques exposés de façon chronique ou aiguë à différentes souches de MCI. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats : (i) une absence de PrP anormale ou (ii) une présence d'une autre conformation non distinguable de celle de la PrP^C associée à des limites de détection des techniques employées. Concernant les organoïdes l'une des explications qui semble la plus probable est la faible quantité de matériel utilisé pour réaliser les WBs ne permettant pas de mettre en évidence la PrP^{res} éventuelle. Bien qu'aucune PrP^{res} n'était détectée, une augmentation du titre infectieux grâce au bioessai et une présence de phénomènes d'agrégations en RT-QuIC ont été observés. Ainsi, il existe une dissociation entre l'infectiosité, la présence de PrP^{res} et des phénomènes d'agrégation.

Les techniques d'amplification

Actuellement, de plus en plus d'équipes tendent à s'affranchir des méthodes d'histologie face aux temps de préparation des échantillons et aux mises au point pouvant être longues et fastidieuses. Dans notre étude, le sang des macaques transfusés a été analysé en PMCA grâce à l'équipe avec laquelle nous collaborons dirigée par le Dr Olivier Andréoletti (INRA-Toulouse). Des analyses complémentaires réalisées par le Dr Daisy Bougard et ses collaborateurs (EFS-Montpellier) viendront prochainement compléter ses données. Ce projet fait partie intégrante de l'ANR *UnmaskingBloodPrion* (2016 – 2018).

La PMCA a détecté des phénomènes anormaux chez les macaques transfusés présentant un syndrome myélopathique suggérant (i) des conditions améliorées permettant de détecter des phénomènes d'agrégation vraisemblablement différents de ceux classiquement décrits et (ii) l'appartenance du syndrome myélopathique dans le large spectre des ESTs. Ces données soulignent qu'une absence de PrP^{res} n'est pas incompatible avec une présence d'infectiosité (transmission du caractère atypique chez les souris avec les homogénats myélopathiques) et la présence de processus d'agrégation (décrits en PMCA). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une conformation particulière

de la PrP anormale existe dans les syndromes myélopathiques conduisant à une absence de PrP^{res} (ou une isoforme non détectable).

De façon plus générale, la mise en place de techniques de détection *ante mortem* est un réel déficit dans la recherche sur les maladies à prions. Cela permettrait de détecter les porteurs asymptomatiques et de les éliminer des dons du sang pour ne pas perpétuer de contaminations inter-individus. Actuellement, de plus en plus de techniques de détection vont dans ce sens (Edgeworth *et al.*, 2011 ; Jackson *et al.*, 2014). Récemment, Daisy Bougard et ses collaborateurs ont publié une étude mettant en avant des résultats prometteurs en PMCA (Bougard *et al.*, 2016) : une PrP anormale a été observée dans le sang de 256 patients dont deux asymptomatiques au moment de l'étude ont développé ultérieurement des signes cliniques (15 et 30 mois après).

Gestion du risque transfusionnel

Contrairement aux injections d'hormones de croissance (hormone de synthèse), il est impossible de se passer de sang humain à l'exception des fractions recombinantes non applicables pour l'ensemble des patients. La sécurisation optimale des transfusions sanguines reposerait sur : la détection de l'infectiosité dans le sang et donc l'exclusion des potentiels porteurs asymptomatiques couplée à une inactivation complète de l'agent sans pour autant perturber l'intégrité et l'efficacité thérapeutique des composants sanguins. Pour l'heure, les mesures mises en place sont axées sur des critères stricts d'inclusion et d'exclusion des donneurs, la leucoréduction systématique des dons de sang ainsi qu'un système de traçabilité performant permettant le suivi des donneurs, des dons et des receveurs.

Le développement de mesures préventives semble limiter le risque de transmission secondaire post-transfusionnel. Ces résultats sont sous-tendus par l'absence de cas post-transfusionnel en France ainsi qu'au RU après la mise en place des mesures. La leucoréduction systématique des dons de sang repose sur différentes données de la littérature soulignant que l'infectiosité est majoritairement contenue dans les globules blancs. Néanmoins, la répartition de l'infectiosité dans les différents composants du sang est difficile à déterminer, seul des ordres d'idées sont décrits (Abdel-Haq, 2015 ; Properzi *et al.*, 2015). Il convient toutefois de noter que l'infectiosité est retrouvée dans l'ensemble des composants sanguins y compris le plasma (Prowse et Bailey, 2000). Les techniques de préparation notamment la nanofiltration semble efficace pour limiter une transmission de l'agent via le plasma (Truchot *et al.*, 2006 ; Yunoki *et al.*, 2008). Toutefois, il demeure des incertitudes sur les méthodes d'analyses employées afin de valider ces tests. En effet, la nanofiltration repose sur la filtration de l'agent en fonction de sa taille. Or, certaines études utilisent des préparations infectieuses (sous forme d'homogénat cérébral) contenant des agrégats de grandes tailles non pertinents avec la taille réellement observée.

Les limites théoriques des mesures de sécurisation du sang en vigueur pourraient être diminuées voire éliminées en utilisant des filtres anti-prion. Ces derniers ont mis en avant leur efficacité *in vivo* (Saunders *et al.*, 2005 ; Sowemimo-Coker *et al.*, 2005 ; Lescoutra-Etchegaray *et al.*, 2014). En parallèle, de nombreuses données prometteuses soulignent la possibilité de pouvoir disposer de techniques de détection de l'agent dans le sang (Edgeworth *et al.*, 2011 ; Saá *et al.*, 2014 ; Lacroux *et al.*, 2014 ; Bougard *et al.*, 2016).

À ce jour, seule la PrP^{VMCI} est considérée à risque dans le cadre des actes transfusionnels.

Ces données sont sous-tendues par la présence de trois cas de contamination post-transfusionnels issus de la transmission de cet agent. Pourtant, les inoculations par voie intraveineuse chez la souris

(Cervenakova *et al.*, 2003) et chez le singe écureuil (Ritchie *et al.*, 2016) soulignent que les formes familiales de maladies à prions sont également transmissibles via les dérivés sanguins. Toutefois, les mesures d'exclusion des donneurs de sang en vigueur permettent de considérer ce risque de transmission comme limité.

Concernant les formes sporadiques de MCJ, le risque de contamination secondaire est également considéré comme théorique (Rapport de novembre 2007 de l'Afssaps). En effet, aucun élément épidémiologique ne permet d'affirmer que ces formes puissent être transmissibles par les produits sanguins et dérivés. Vraisemblablement, la distribution tissulaire périphérique de l'infectiosité décrite chez les patients sporadiques est moins élevée (et donc présente moins de risque en termes de santé publique) par rapport à celle retrouvée pour la vMCJ. Récemment, une étude souligne que ces connaissances peuvent être affinées. En effet, la présence d'infectiosité a été mise en évidence dans la peau de patients atteints de formes sporadiques par bioessai (Orrú *et al.*, 2017). Cette nouvelle étude pose certes un potentiel risque de transmission via la peau et les instruments chirurgicaux associés mais étend notre vision des connaissances en rappelant que l'infectiosité contenue chez les patients sporadiques pourrait être présente de façon plus importante dans le sang et constituer un réel réservoir de contamination. De plus, face à la plus forte incidence des formes sporadiques que les autres formes, il convient d'appliquer le principe de précaution.

D'ailleurs en France, l'ensemble des lots contenant des plasmas issus de personnes ayant développé *a posteriori* une MCJ sporadique ainsi que familiale ont été rappelé grâce à un système de traçabilité efficace. Dernièrement, deux patients hémophiles atteints d'une forme sporadique de MCJ ont été décrits (Urwin *et al.*, 2017). Ces patients présentaient un risque accru de vMCJ dans la mesure où ils avaient été traités par médecine transfusionnelle avec des lots potentiellement à risque. Ces données peuvent souligner soit un événement fortuit dans le contexte d'une surveillance renforcée au RU, comme le souligne les auteurs de cette publication (Urwin *et al.*, 2017), soit la possibilité que cette forme sporadique puisse être liée à une contamination sanguine. Cette dernière hypothèse ne peut être exclue et peut être sous-tendue par une modification de la souche suite à l'exposition par voie intraveineuse. En effet, nos travaux mettent en avant la présence de profils atypiques lors d'une inoculation par voie intraveineuse de l'agent de la vMCJ (Comoy *et al.*, 2017). Il n'en demeure pas moins que ces deux patients présentaient l'ensemble des caractéristiques décrites dans les formes sporadiques de MCJ, contrairement à nos observations faites chez les macaques myélopathiques (Comoy *et al.*, 2017)

Les organoïdes neuro-ectodermiques : une alternative aux modèles *in vitro* et *in vivo* d'infection existants ?

Le bioessai nous a permis d'appréhender la caractérisation des souches myélopathiques décrites chez les macaques transfusés : (i) mise en évidence du caractère transmissible à des modèles murins conventionnels et immunodéficient (Comoy *et al.*, 2017 ; Rontard *et al.*, en préparation) (ii) validation de la présence de PrP^{res} dans des souris conventionnelles exposées (Comoy *et al.*, 2017). Les études de retransmissions préliminaires dans d'autres modèles murins mettent en évidence que ces phénotypes sont également transmissibles aux souris transgéniques sur-exprimant la PrP^C de macaque.

Face à cette hétérogénéité de transmission, les modèles cellulaires permettraient d'étudier les mécanismes de répliquations des souches classiques et atypiques. Ils permettraient également de

s'affranchir, du moins en partie, des expériences *in vivo* s'avérant chronophages (jusqu'à 2 ans et demie chez la souris), coûteuses et éthiquement peu acceptables.

En 1959, Russell et Burch ont proposé la règle des « 3Rs » ([Russell et Burch, 1959](#)) :

- Réduire : le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques ;
- Raffiner : la méthode utilisée (analyses statistiques, inclusion de points limites) ;
- Remplacer : les modèles animaux par des techniques *in vitro*.

Depuis ce principe a été introduit dans la directive européenne (2010/63/UE) et appliqué en France (décret du 1^{er} février 2013). Sur la base du principe des « 3Rs » nous avons tenu à proposer une alternative à l'expérimentation animale. Dans ce sens, les travaux de l'équipe de Béringue ont dernièrement mis au point une technique optimisée de PMCA s'affranchissant d'homogénat cérébraux comme substrat ([Moudjou et al., 2016](#)) : amplification de plusieurs souches de prions grâce à des cellules épithéliales de lapin (RK13).

L'utilisation de cellules iPS constituent une alternative prometteuse à l'expérimentation animale en limitant considérablement le nombre d'animaux utilisés. Les cellules iPS offrent de nombreux avantages en termes d'applications thérapeutiques mais surtout dans la modélisation des pathologies. De plus, ces cellules peuvent être issues de différentes espèces animales en fonction des axes de recherche : bovines ([Talluri et al., 2015](#)), murines, simiennes ou encore de issues de moutons ([Liu et al., 2012](#)). La reprogrammation de cellules somatiques peut être réalisée à partir de prélèvements peu invasifs offrant ainsi des perspectives intéressantes. Concernant les cellules iPS humaines, elles permettent de pouvoir travailler sur une quantité théoriquement illimitée de tissu humain tout en s'affranchissant des règles éthiques en vigueur sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines. À ce jour, une seule équipe a réussi à détecter une PrP^{res} néoformée à partir d'astrocytes différenciés de cellules iPS ([Krejciova et al., 2017](#)). Ces résultats encourageants soulignent que les cellules iPS humaines pourraient être un modèle très utile pour étudier les prions et, à long terme, tester de nouveaux médicaments candidats.

Les expositions chroniques des MBs humains apportent une preuve du concept de la sensibilité de ce modèle à au moins un isolat de MCJ sporadique. En effet, nous sommes en mesure d'observer une réplification de l'infectiosité grâce à ce modèle de culture en 3D. Bien que ces structures soient à leurs prémices au niveau de la caractérisation et nécessitent des essais avec différentes souches de prions, il apparaît qu'ils pourraient, à terme, être un modèle d'infection prion. Un autre élément pertinent à relever est que chaque MB est unique et à prendre en tant que tel. À mon sens, cette hétérogénéité n'est pas un frein à la mise en place d'un modèle cellulaire et constitue même un modèle d'autant plus pertinent dans l'évaluation du risque de santé publique.

De nombreuses perspectives sont envisageables une fois que les neuro-organoïdes seront validés et que nous disposerons de techniques de détection. Dans notre projet seules les souches vMCJ et sMCJ ont été testées sur les organoïdes humains et simiens. Il serait donc pertinent de tester d'autres souches humaines ainsi que les souches issues de macaques myélopathiques. Pour ce faire, il faudrait en parallèle exposer les organoïdes humains et simiens avec des souches sporadiques, vMCJ et myélopathiques. L'objectif serait multiple :

- Déterminer dans quelle proportion les organoïdes simiens et humains sont sensibles aux souches de prions classiques ;
- Déterminer si les MBs humains sont sensibles aux souches de prions atypiques et donc si cela pourrait représenter un risque en termes de santé publique ; ce qui implique de disposer de techniques de lectures adaptées (pistes explorées au laboratoire avec des démasquages améliorés d'épitopes en immunohistochimie) ;
- Déterminer si des différences en termes de marqueurs cellulaires, distribution de la PrP^C, distribution des dépôts anormaux de la PrP sont retrouvés en fonction des souches testées pour disséquer la physiopathologie centrale de ces souches.

Ces dernières hypothèses nécessitent que nous soyons en mesure d'obtenir des techniques de détection robustes et optimisées. Il faudrait donc inoculer ces MBs à des souris sensibles aux souches exposées : souris Swiss (souches vMCJ et myélopathiques) et souris humanisées (souche sporadique). De plus, il est primordial de discuter de la pertinence d'avoir un modèle mimant au plus près le SNC dans la mesure où les souches myélopathiques affectent préférentiellement la moelle épinière.

De façon plus large il semble possible que ce nouveau modèle d'étude puisse permettre de modéliser d'autres maladies neurodégénératives notamment les protéinopathies. En effet, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la sclérose latérale amyotrophique présentent de nombreuses similitudes avec les maladies à prions. Ces pathologies sont qualifiées de protéinopathies associées à des mécanismes de propagation de type prion (« *prion-like* ») (Luehmann *et al.*, 2006 ; Jucker et Walker, 2013 ; Walker et Jucker, 2015). Ces pathologies sont surtout caractérisées par des mécanismes biologiques complexes et communs à savoir une altération du métabolisme protéique associée à l'accumulation anormale de protéines. Elles sont caractérisées par une dégradation progressive du SNC avec une destruction d'une population précise de cellules nerveuses (par exemple les neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson) associées à des altérations des transmissions synaptiques.

Elles ont toutes des atteintes cérébrales diverses (neurologiques et cognitives) associées à une diversité symptomatologique (troubles moteurs, cognitifs, et mnésiques) avec des affections invalidantes pour le patient et son entourage. Dépourvu de traitement curatif, les lésions neurologiques sont irréversibles et conduisent à la mort du patient. La distinction majeure avec les maladies à prion reste qu'aucune étude n'a permis de mettre en évidence que les protéines anormalement accumulées dans les protéinopathies soient infectieuses et transmissibles. Ainsi, dans un contexte où le recours à des animaux à des fins scientifiques tant à être de plus en plus limité, les modèles cellulaires contribuent une alternative intéressante afin d'étudier les maladies à prions. Les organoïdes neuro-ectodermiques, une fois les techniques de détection optimisées, pourraient être un excellent candidat.

Conclusion

Bien que nous soyons plus de 20 ans après l'apparition des premiers cas de variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), il persiste un risque de transmission d'Homme à Homme comme cela a été souligné suite à l'apparition de trois cas secondaires à des actes transfusionnels. L'inquiétude réside dans le caractère transmissible de l'agent, la présence d'infectiosité dans un grand nombre de tissus et l'absence de détection *ante mortem*. Plusieurs recherches tendent à mettre en place des techniques de détection néanmoins, elles ne sont pas encore appliquées en routine chez l'Homme.

Face au risque avéré de contamination transfusionnelle interhumaine de la vMCJ, une évaluation expérimentale dans le modèle du macaque cynomolgus a été conduite au sein du laboratoire. Elle a permis de distinguer différents phénotypes (classiques, asymptomatiques et myélopathiques) chez les macaques transfusés. L'analyse de l'ensemble des ganglions lymphatiques des macaques transfusés vMCJ souligne une forte hétérogénéité dans la réplication de la PrP anormale. La majorité des macaques myélopathiques ne présentent pas de réplication périphérique bien que ce phénotype soit transmissible à des souris conventionnelles. Les travaux que nous avons réalisés contribuent à une meilleure compréhension des différentes souches de macaques obtenues après transfusion expérimentale et ont été complétées par l'inoculation à des souris immunodéficientes. Les transmissions à ces souris immunodéficientes révèlent que les souches atypiques sont transmissibles par voie périphérique et en absence d'un système immunitaire fonctionnel. Cette caractérisation des souches myélopathiques permet de suggérer qu'elles utilisent des voies de réplication non liées aux structures immunitaires. En parallèle, l'étude descriptive d'un large panel de rates de plusieurs espèces a permis d'émettre l'hypothèse que des différences anatomiques pourraient être à l'origine de phénomènes de réplication périphérique différents en fonction des souches utilisées.

La compréhension des mécanismes centraux a nécessité la mise en place d'un modèle d'infection *in vitro*, alternatif à l'expérimentation animale. Nous avons généré des organoïdes cérébraux cultivés en trois dimensions à partir de cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS) humaines, et pour la première fois, des organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes simiennes et murines. Récemment décrites, les cellules souches pluripotentes offrent une alternative prometteuse à l'utilisation des cellules souches embryonnaires. Nos résultats d'infection confirment que les organoïdes cérébraux humains sont sensibles à au moins un isolat de prion associé aux formes sporadiques humaines, constituant ainsi un modèle *in vitro* de cellules humaines infectables par des souches humaines. Mimant la complexité du cerveau humain, le modèle d'organoïde cérébral offre un nouvel outil d'étude déclinable dans les études de physiopathologie et thérapeutiques des maladies à prions mais également pour d'autres protéinopathies neurodégénératives pour lesquelles des mécanismes de type prion ont été observés.

Références bibliographiques

- Aasen, Trond, Angel Raya, Maria J. Barrero, Elena Garreta, Antonella Consiglio, Federico Gonzalez, Rita Vassena, et al. 2008. « Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes ». *Nature Biotechnology* 26 (11):1276-84.
- Abdel-Haq, Hanin. 2015. « Detection of Water-Soluble Disease-Associated PrP Species in Blood and Brain of Scrapie-Infected Hamster ». *Archives of Virology* 160 (9):2219-29.
- Adle-Biassette, Homa, Catherine Verney, Katell Peoc'h, Marie-Christine Dauge, Férechté Razavi, Laurence Choudat, Pierre Gressens, Herbert Budka, et Dominique Henin. 2006. « Immunohistochemical Expression of Prion Protein (PrP^C) in the Human Forebrain during Development ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (7):698-706.
- Aguzzi, A. 2001. « Recent Developments in the Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy of Prion Diseases ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 3 (1):25-36.
- Aguzzi, Adriano, Frank L. Heppner, Mathias Heikenwalder, Marco Prinz, Kirsten Mertz, Harald Seeger, et Markus Glatzel. 2003. « Immune System and Peripheral Nerves in Propagation of Prions to CNS ». *British Medical Bulletin* 66:141-59.
- Aguzzi, Adriano, et Yingjun Liu. 2017. « A Role for Astroglia in Prion Diseases ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (12):3477-79.
- Aguzzi, Adriano, Mario Nuvolone, et Caihong Zhu. 2013. « The Immunobiology of Prion Diseases ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (12):888-902.
- Aguzzi, Adriano, et Christina J. Sigurdson. 2004. « Antiprion Immunotherapy: To Suppress or to Stimulate? ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (9):725-36.
- Aguzzi A., et Zhu C. 2017. « Microglia in prion diseases ». *Journal of Clinical investigation*.127(9): 3230-3239.
- Akimov, Sergey, Oksana Yakovleva, Irina Vasilyeva, Carroll McKenzie, et Larisa Cervenakova. 2008. « Persistent Propagation of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Agent in Murine Spleen Stromal Cell Culture with Features of Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Virology* 82 (21):10959-62.
- Aldhous, P. 1990. « BSE: Spongiform Encephalopathy Found in Cat ». *Nature* 345 (6272):194.
- Alleaume-Butaux, Aurélie, Simon Nicot, Mathéa Pietri, Anne Baudry, Caroline Dakowski, Philippe Tixador, Hector Ardila-Osorio, et al. 2015. « Double-Edge Sword of Sustained ROCK Activation in Prion Diseases through Neuritogenesis Defects and Prion Accumulation ». *PLoS Pathogens* 11 (8).
- Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig, et M. C. Clarke. 1967. « Does the Agent of Scrapie Replicate without Nucleic Acid? ». *Nature* 214 (5090):764-66.
- Alper, T., D. A. Haig, et M. C. Clarke. 1966. « The Exceptionally Small Size of the Scrapie Agent ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 22 (3):278-84.
- Altmeyen, Hermann C., Johannes Prox, Berta Puig, Frank Dohler, Clemens Falker, Susanne Krasemann, et Markus Glatzel. 2013. « Roles of Endoproteolytic α -Cleavage and Shedding of the Prion Protein in Neurodegeneration ». *The FEBS Journal* 280 (18):4338-47.
- Alzualde, A., F. Moreno, P. Martínez-Lage, I. Ferrer, A. Gorostidi, D. Otaegui, L. Blázquez, et al. 2010. « Somatic Mosaicism in a Case of Apparently Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Carrying a de Novo D178N Mutation in the PRNP Gene ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B (7):1283-91.
- Andréoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. van Keulen, F. Schelcher, J. M. Elsen, et F. Lantier. 2000. « Early Accumulation of PrP(Sc) in Gut-Associated Lymphoid and Nervous Tissues of Susceptible Sheep from a Romanov Flock with Natural Scrapie ». *The Journal of General Virology* 81 (Pt 12):3115-26.
- Andréoletti, Olivier, Caroline Lacroux, Armelle Chabert, Laurent Monnereau, Guillaume Tabouret, Frédéric Lantier, Patricia Berthon, et al. 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):2607-16.
- Andréoletti, Olivier, Claire Litaie, Hugh Simmons, Fabien Corbière, Séverine Lugan, Pierrette Costes, François Schelcher, Didier Vilette, Jacques Grassi, et Caroline Lacroux. 2012. « Highly Efficient Prion Transmission by Blood Transfusion ». *PLoS Pathogens* 8 (6).
- Angers, Rachel C., Shawn R. Browning, Tanya S. Seward, Christina J. Sigurdson, Michael W. Miller, Edward A. Hoover, et Glenn C. Telling. 2006. « Prions in Skeletal Muscles of Deer with Chronic Wasting Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 311 (5764):1117.
- Annus, Ádám, Anett Csáti, et László Vécsei. 2016. « Prion Diseases: New Considerations ». *Clinical Neurology and Neurosurgery* 150 (novembre):125-32.
- Antony, H, AP Wiegman, MQ Wei, YO Chernoff, KK Khanna, et AL Munn. 2012. « Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer ». *Cancer Metastasis Reviews* 31 (1-2):1-19.
- Antonyuk, S. V., C. R. Trevitt, R. W. Strange, G. S. Jackson, D. Sangar, M. Batchelor, S. Cooper, et al. 2009. « Crystal Structure of Human Prion Protein Bound to a Therapeutic Antibody ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8):2554-58.
- Asante, Emmanuel A., Jacqueline M. Linehan, Melanie Desbruslais, Susan Joiner, Ian Gowland, Andrew L. Wood, Julie Welch, et al. 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):6358-66.
- Asante, Emmanuel A., Michelle Smidak, Andrew Grimshaw, Richard Houghton, Andrew Tomlinson, Asif Jeelani, Tatiana Jakubcova, et al. 2015. « A Naturally Occurring Variant of the Human Prion Protein Completely Prevents Prion Disease ». *Nature* 522 (7557).
- Atarashi, Ryuichiro, Katsuya Satoh, Kazunori Sano, Takayuki Fuse, Naohiro Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Takehiro Matsubara, et al. 2011. « Ultrasensitive Human Prion Detection in Cerebrospinal Fluid by Real-Time Quaking-Induced Conversion ». *Nature Medicine* 17 (2):175-78.
- Atarashi, Ryuichiro, Jason M. Wilham, Leah Christensen, Andrew G. Hughson, Roger A. Moore, Lisa M. Johnson, Henry A. Onwubiko, Suzette A. Priola, et Byron Caughey. 2008. « Simplified Ultrasensitive Prion Detection by Recombinant PrP Conversion with Shaking ». *Nature Methods* 5 (3):211-12.
- Atkinson, Caroline J., Kai Zhang, Alan L. Munn, Adrian Wiegman, et Ming Q. Wei. 2016. « Prion Protein Scrapie and the Normal Cellular Prion Protein ». *Prion* 10 (1):63-82.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. 2003. « Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function ». *Genes & Development* 17 (1):126-40.
- Azevedo, M. F., F. Nascimento, L. Quintella, A. L. Rosso, P. A. Maranhão Filho, R. B. Corrêa, L. Chimelli, M. Vincent, et S. A. Novis. 2001. « [Creutzfeldt-Jakob disease: case report with spinal cord involvement] ». *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 59 (4):964-67.
- Baker, H. F., R. M. Ridley, et G. A. Wells. 1993. « Experimental Transmission of BSE and Scrapie to the Common Marmoset ». *The Veterinary Record* 132 (16):403-6.
- Bakkebo, Maren K., Sophie Mouillet-Richard, Arild Espenes, Wilfred Goldmann, Jörg Tatzelt, et Michael A. Tranulis. 2015. « The Cellular Prion Protein: A Player in Immunological Quiescence ». *Frontiers in Immunology* 6:450.
- Banks, W.A., Sandra M. Robinson, R. Diaz-Espinoza, A. Urayama, et C. Soto. 2009. « Transport of prion protein across the blood-brain barrier ». *Experimental neurology* 218 (1):162-67.
- Banks, William A., Michael L. Niehoff, Celine Adessi, et Claudio Soto. 2004. « Passage of Murine Scrapie Prion Protein across the Mouse Vascular Blood-Brain Barrier ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (1):125-30.
- Barmada, Sami, Pedro Piccardo, Keiji Yamaguchi, Bernardino Ghetti, et David A. Harris. 2004. « GFP-Tagged Prion Protein Is Correctly Localized and Functionally Active in the Brains of Transgenic Mice ». *Neurobiology of Disease* 16 (3):527-37.

- Baron, Gerald S., Ana C. Magalhães, Marco A. M. Prado, et Byron Caughey. 2006. « Mouse-Adapted Scrapie Infection of SN56 Cells: Greater Efficiency with Microsome-Associated versus Purified PrP-Res ». *Journal of Virology* 80 (5):2106-17.
- Baron, Thierry, Anna Bencsik, Anne-Gaëlle Biacabe, Eric Morignat, et Richard A. Bessen. 2007. « Phenotypic Similarity of Transmissible Mink Encephalopathy in Cattle and L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy in a Mouse Model ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (12):1887-94.
- Baron, Thierry, Johann Vulin, Anne-Gaëlle Biacabe, Latefa Lakhdar, Jérémy Verchere, Juan-Maria Torres, et Anna Bencsik. 2011. « Emergence of Classical BSE Strain Properties during Serial Passages of H-BSE in Wild-Type Mice ». *PLoS One* 6(1).
- Barry, R. A., et S. B. Prusiner. 1986. « Monoclonal Antibodies to the Cellular and Scrapie Prion Proteins ». *The Journal of Infectious Diseases* 154 (3):518-21.
- Bartz, Jason C., Crista Dejoia, Tammy Tucker, Anthony E. Kincaid, et Richard A. Bessen. 2005. « Extraneural Prion Neuroinvasion without Lymphoreticular System Infection ». *Journal of Virology* 79 (18):11858-63.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Wälchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, et C. Weissmann. 1986. « Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene ». *Cell* 46 (3):417-28.
- Beck, Jon A., Mark Poulter, Tracy A. Campbell, Gary Adamson, James B. Uphill, Rita Guerreiro, Graham S. Jackson, et al. 2010. « PRNP Allelic Series from 19 Years of Prion Protein Gene Sequencing at the MRC Prion Unit ». *Human Mutation* 31 (7).
- Beekes, M., E. Baldauf, et H. Diringer. 1996. « Sequential Appearance and Accumulation of Pathognomonic Markers in the Central Nervous System of Hamsters Orally Infected with Scrapie ». *The Journal of General Virology*. 77(8) : 1925-34.
- Beekes, M., P. A. McBride, et E. Baldauf. 1998. « Cerebral Targeting Indicates Vagal Spread of Infection in Hamsters Fed with Scrapie ». *The Journal of General Virology* 79 (3):601-7.
- Behrens, Axel. 2003. « Physiological and Pathological Functions of the Prion Protein Homologue Dpl ». *British Medical Bulletin* 66:35-42.
- Behrens, Axel, Nicolas Genoud, Heike Naumann, Thomas Rülcke, Fredi Janett, Frank L. Heppner, Birgit Ledermann, et Adriano Aguzzi. 2002. « Absence of the Prion Protein Homologue Doppel Causes Male Sterility ». *The EMBO Journal* 21 (14):3652-58.
- Béland, Maxime, Julie Motard, Alice Barbarin, et Xavier Roucou. 2012. « PrP(C) Homodimerization Stimulates the Production of PrPC Cleaved Fragments PrPN1 and PrPC1 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (38):13255-63.
- Belondrade, Maxime, Simon Nicot, Vincent Béringue, Joliette Coste, Sylvain Lehmann, et Daisy Bougard. 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).
- Bencsik, Anna A., Anthony W. Coleman, Sabine O. S. Debeer, Hervé Perron, et Aly Moussa. 2006. « Amplified Immunohistochemical Detection of PrPsc in Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Using Streptomycin ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 54 (8):849-53.
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman, et D. C. Bolton. 1992. « Nearly Ubiquitous Tissue Distribution of the Scrapie Agent Precursor Protein ». *Neurology* 42 (1):149-56.
- Benestad, Sylvie L., Jean-Noël Arsac, Wilfred Goldmann, et Maria Nöremark. 2008. « Atypical/Nor98 Scrapie: Properties of the Agent, Genetics, and Epidemiology ». *Veterinary Research* 39 (4):19.
- Benetti, Federico, Xevi Biarnés, Francesco Attanasio, Gabriele Giachin, Enrico Rizzarelli, et Giuseppe Legname. 2014. « Structural Determinants in Prion Protein Folding and Stability ». *Journal of Molecular Biology* 426 (22):3796-3810.

- Benvegnù, Stefano, Diego Franciotta, Josh Sussman, Angela Bachi, Elisabetta Zardini, Paola Torreri, Cedric Govaerts, Salvatore Pizzo, et Giuseppe Legname. 2009. « Prion Protein Paralog Doppel Protein Interacts with Alpha-2-Macroglobulin: A Plausible Mechanism for Doppel-Mediated Neurodegeneration ». *PLoS One* 4 (6).
- Beraldo, Flavio H., Camila P. Arantes, Tiago G. Santos, Cleiton F. Machado, Martin Roffe, Gláucia N. Hajj, Kil S. Lee, et al. 2011. « Metabotropic Glutamate Receptors Transduce Signals for Neurite Outgrowth after Binding of the Prion Protein to Laminin γ 1 Chain ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (1):265-79.
- Béringue, Vincent, Olivier Andréoletti, Annick Le Dur, Rachid Essalmani, Jean-Luc Vilotte, Caroline Lacroux, Fabienne Reine, et al. 2007. « A Bovine Prion Acquires an Epidemic Bovine Spongiform Encephalopathy Strain-like Phenotype on Interspecies Transmission ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (26):6965-71.
- Béringue, Vincent, Laëtizia Herzog, Fabienne Reine, Annick Le Dur, Cristina Casalone, Jean-Luc Vilotte, et Hubert Laude. 2008. « Transmission of Atypical Bovine Prions to Mice Transgenic for Human Prion Protein ». *Emerging Infectious Diseases* 14 (12):1898-1901.
- Béringue, Vincent, Annick Le Dur, Philippe Tixador, Fabienne Reine, Laurence Lepourry, Armand Perret-Liaudet, Stéphane Haïk, Jean-Luc Vilotte, Michel Fontés, et Hubert Laude. 2008. « Prominent and Persistent Extraneural Infection in Human PrP Transgenic Mice Infected with Variant CJD ». *PLoS ONE*. 3 (1).
- Bernoulli, C., J. Siegfried, G. Baumgartner, F. Regli, T. Rabinowicz, D. C. Gajdusek, et C. J. Gibbs. 1977. « Danger of Accidental Person-to-Person Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease by Surgery ». *Lancet (London, England)* 1 (8009):478-79.
- Besnoit, et Morel. 1898. « Note sur les lésions nerveuses de la tremblante 883 mouton ». *Revue Veterinaire*, n° 23:397-400.
- Bessen, R. A., et R. F. Marsh. 1992. « Identification of Two Biologically Distinct Strains of Transmissible Mink Encephalopathy in Hamsters ». *The Journal of General Virology*. 73 (2):329-34.
- Betmouni, S, V. H Perry, et J. L Gordon. 1996. « EVIDENCE FOR AN EARLY INFLAMMATORY RESPONSE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF MICE WITH SCRAPIE ». *Neuroscience* 74 (1):1-5.
- Biacabe, Anne-Gaëlle, Jean-Louis Laplanche, Stephen Ryder, et Thierry Baron. 2004. « Distinct Molecular Phenotypes in Bovine Prion Diseases ». *EMBO Reports*. 5 (1):110-15.
- Bishop, M. T., P. Hart, L. Aitchison, H. N. Baybutt, C. Plinston, V. Thomson, N. L. Tuzi, et al. 2006. « Predicting Susceptibility and Incubation Time of Human-to-Human Transmission of vCJD ». *The Lancet. Neurology* 5 (5):393-98.
- Bishop, Matthew T., Abigail B. Diack, Diane L. Ritchie, James W. Ironside, Robert G. Will, et Jean C. Manson. 2013. « Prion infectivity in the spleen of a PRNP heterozygous individual with subclinical variant Creutzfeldt–Jakob disease ». *Brain* 136 (4):1139-45.
- Black, Stefanie A. G., Peter K. Stys, Gerald W. Zamponi, et Shigeki Tsutsui. 2014. « Cellular Prion Protein and NMDA Receptor Modulation: Protecting against Excitotoxicity ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2:45.
- Blättler, T., S. Brandner, A. J. Raeber, M. A. Klein, T. Voigtländer, C. Weissmann, et A. Aguzzi. 1997. « PrP-Expressing Tissue Required for Transfer of Scrapie Infectivity from Spleen to Brain ». *Nature* 389 (6646):69-73.
- Boëlle, Pierre-Yves, Jean-Yves Cesbron, et Alain-Jacques Valleron. 2004. « Epidemiological Evidence of Higher Susceptibility to vCJD in the Young ». *BMC Infectious Diseases* 4 (8):26.
- Bons, N., N. Mestre-Frances, P. Belli, F. Cathala, D. C. Gajdusek, et P. Brown. 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):4046-51.
- Bons, N., N. Mestre-Francés, Y. Charnay, et F. Tagliavini. 1996. « Spontaneous Spongiform Encephalopathy in a Young Adult Rhesus Monkey ». *Lancet (London, England)* 348 (9019):55.

- Bons, N., N. Mestre-Frances, I. Guiraud, et Y. Charnay. 1997. « Prion Immunoreactivity in Brain, Tonsil, Gastrointestinal Epithelial Cells, and Blood and Lymph Vessels in Lemurian Zoo Primates with Spongiform Encephalopathy ». *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie* 320 (12):971-79.
- Bons, Nöelle, Sylvain Lehmann, Nadine Mestre-Francès, Dominique Dormont, et Paul Brown. 2002. « Brain and Buffy Coat Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy to the Primate *Microcebus Murinus* ». *Transfusion* 42 (5):513-16.
- Borchelt, D. R., M. Rogers, N. Stahl, G. Telling, et S. B. Prusiner. 1993. « Release of the Cellular Prion Protein from Cultured Cells after Loss of Its Glycoinositol Phospholipid Anchor ». *Glycobiology* 3 (4):319-29.
- Borchelt, D. R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl, et S. B. Prusiner. 1990. « Scrapie and Cellular Prion Proteins Differ in Their Kinetics of Synthesis and Topology in Cultured Cells ». *The Journal of Cell Biology* 110 (3):743-52.
- Borchelt, D. R., A. Taraboulos, et S. B. Prusiner. 1992. « Evidence for Synthesis of Scrapie Prion Proteins in the Endocytic Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (23):16188-99.
- Bosma, G. C., R. P. Custer, et M. J. Bosma. 1983. « A Severe Combined Immunodeficiency Mutation in the Mouse ». *Nature* 301 (5900):527-30.
- Bosque, P. J., et S. B. Prusiner. 2000. « Cultured Cell Sublines Highly Susceptible to Prion Infection ». *Journal of Virology* 74 (9):4377-86.
- Bougard, Daisy, Jean-Philippe Brandel, Maxime Bélondrade, Vincent Béringue, Christiane Segarra, Hervé Fleury, Jean-Louis Laplanche, et al. 2016. « Detection of Prions in the Plasma of Presymptomatic and Symptomatic Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Science Translational Medicine* 8 (370).
- Brandel, Jean-Philippe, Craig A. Heath, Mark W. Head, Etienne Levavasseur, Richard Knight, Jean-Louis Laplanche, Jan Pm Langeveld, et al. 2009. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in France and the United Kingdom: Evidence for the Same Agent Strain ». *Annals of Neurology* 65 (3):249-56.
- Brandel, Jean-Philippe, Michael Preece, Paul Brown, Esther Croes, Jean-Louis Laplanche, Yves Agid, Robert Will, et Annick Alperovitch. 2003. « Distribution of Codon 129 Genotype in Human Growth Hormone-Treated CJD Patients in France and the UK ». *Lancet (London, England)* 362 (9378):128-30.
- Brandner, Sebastian, et Zane Jaunmuktane. 2017. « Prion Disease: Experimental Models and Reality ». *Acta Neuropathologica* 133 (2):197-222.
- Bravard, Anne, Frédéric Auvré, Damiano Fantini, Jacqueline Bernardino-Sgherri, Ludmilla Sissoëff, Mathieu Daynac, Zhou Xu, et al. 2015. « The Prion Protein Is Critical for DNA Repair and Cell Survival after Genotoxic Stress ». *Nucleic Acids Research* 43 (2):904-16.
- Brazier, Marcus W., Paul Davies, Esmie Player, Frank Marken, John H. Viles, et David R. Brown. 2008. « Manganese Binding to the Prion Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19):12831-39.
- Bremer, Juliane, Frank Baumann, Cinzia Tiberi, Carsten Wessig, Heike Fischer, Petra Schwarz, Andrew D. Steele, et al. 2010. « Axonal Prion Protein Is Required for Peripheral Myelin Maintenance ». *Nature Neuroscience* 13 (3):310-18.
- Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, et al. 1997. « The Cellular Prion Protein Binds Copper in Vivo ». *Nature* 390 (6661):684-87.
- Brown, D R, B S Wong, F Hafiz, C Clive, S J Haswell, et I M Jones. 1999. « Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. » *Biochemical Journal* 344 (Pt 1):1-5.
- Brown, P. 2005. « Pathogenesis and Transfusion Risk of Transmissible Spongiform Encephalopathies ». *Developments in Biologicals* 120:27-33.
- Brown, P., C. J. Gibbs, P. Rodgers-Johnson, D. M. Asher, M. P. Sulima, A. Bacote, L. G. Goldfarb, et D. C. Gajdusek. 1994. « Human Spongiform Encephalopathy: The National Institutes of Health Series of 300 Cases of Experimentally Transmitted Disease ». *Annals of Neurology* 35 (5):513-29.

- Brown, Paul, Jean-Philippe Brandel, Takeshi Sato, Yosikazu Nakamura, Jan MacKenzie, Robert G. Will, Anna Ladogana, Maurizio Pocchiari, Ellen W. Leschek, et Lawrence B. Schonberger. 2012. « Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease, Final Assessment ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (6):901-7.
- Brown, Paul, et Larisa Cervenakova. 2005. « A Prion Lexicon (out of Control) ». *Lancet (London, England)* 365 (9454):122.
- Bruce, M. E. 1985. « Agent Replication Dynamics in a Long Incubation Period Model of Mouse Scrapie ». *The Journal of General Virology*. 66 (12):2517-22.
- Bruce, M. E., et A. G. Dickinson. 1979. « Biological stability of different classes of scrapie agent », 1979.
- Bruce, M. E. 1987. « Biological Evidence That Scrapie Agent Has an Independent Genome ». *The Journal of General Virology* 68 (1) :79-89.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, et al. 1997. « Transmissions to Mice Indicate That “New Variant” CJD Is Caused by the BSE Agent ». *Nature*. 389 (6650): 498-501.
- Büeler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, et C. Weissmann. 1993. « Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie ». *Cell* 73 (7):1339-47.
- Büeler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, et C. Weissmann. 1992. « Normal Development and Behaviour of Mice Lacking the Neuronal Cell-Surface PrP Protein ». *Nature* 356 (6370):577-82.
- Burthem, J., B. Urban, A. Pain, et D. J. Roberts. 2001. « The Normal Cellular Prion Protein Is Strongly Expressed by Myeloid Dendritic Cells ». *Blood* 98 (13):3733-38.
- Buschmann, A., A.-G. Biacabe, U. Ziegler, A. Bencsik, J.-Y. Madec, G. Erhardt, G. Lühken, T. Baron, et M. H. Groschup. 2004. « Atypical Scrapie Cases in Germany and France Are Identified by Discrepant Reaction Patterns in BSE Rapid Tests ». *Journal of Virological Methods* 117 (1):27-36.
- Buschmann, A., A. Gretzschel, A.-G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone, et Martin H. Groschup. 2006. « Atypical BSE in Germany--Proof of Transmissibility and Biochemical Characterization ». *Veterinary Microbiology* 117 (2-4):103-16.
- Butler, D. A., M. R. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury, et S. B. Prusiner. 1988. « Scrapie-Infected Murine Neuroblastoma Cells Produce Protease-Resistant Prion Proteins ». *Journal of Virology* 62 (5):1558-64.
- Byers, Blake, Branden Cord, Ha Nam Nguyen, Birgitt Schüle, Lief Fenno, Patrick C. Lee, Karl Deisseroth, J. William Langston, Renee Reijo Pera, et Theo D. Palmer. 2011. « SNCA Triplication Parkinson’s Patient’s iPSC-Derived DA Neurons Accumulate α -Synuclein and Are Susceptible to Oxidative Stress ». *PLoS One*. 6 (11).
- Cahill, M. R., T. Murphy, M. Khan, J. Fagan, et W. G. Murphy. 2010. « Phase I/II Safety Study of Transfusion of Prion-Filtered Red Cell Concentrates in Transfusion-Dependent Patients ». *Vox Sanguinis* 99 (2):174-76.
- Caiazzo, Massimiliano, Yuya Okawa, Adrian Ranga, Alessandra Piersigilli, Yoji Tabata, et Matthias P. Lutolf. 2016. « Defined Three-Dimensional Microenvironments Boost Induction of Pluripotency ». *Nature Materials*. 15 (3):344-52.
- Calella, Anna Maria, Mélissa Farinelli, Mario Nuvolone, Osvaldo Mirante, Rita Moos, Jeppe Falsig, Isabelle M. Mansuy, et Adriano Aguzzi. 2010. « Prion Protein and Abeta-Related Synaptic Toxicity Impairment ». *EMBO Molecular Medicine* 2 (8):306-14.
- Capellari, S., P. Parchi, P. Cortelli, P. Avoni, G. P. Casadei, C. Bini, A. Baruzzi, et al. 2008. « Sporadic Fatal Insomnia in a Fatal Familial Insomnia Pedigree ». *Neurology* 70 (11):884-85.
- Capobianco, Raffaella, Cristina Casalone, Silvia Suardi, Michela Mangieri, Claudia Miccolo, Lucia Limido, Marcella Catania, et al. 2007. « Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? » *PLoS Pathogens*. 3 (3).

- Caramelli, M., G. Ru, C. Casalone, E. Bozzetta, P. L. Acutis, A. Calella, et G. Forloni. 2001. « Evidence for the Transmission of Scrapie to Sheep and Goats from a Vaccine against *Mycoplasma Agalactiae* ». *The Veterinary Record* 148 (17):531-36.
- Cardone, Franco, Steve Simoneau, Aude Arzel, Maria Puopolo, Vito Angelo Berardi, Hanin Abdel-Haq, Roberta Galeno, et al. 2012. « Comparison of Nanofiltration Efficacy in Reducing Infectivity of Centrifuged versus Ultracentrifuged 263K Scrapie-Infected Brain Homogenates In “spiked” albumin Solutions ». *Transfusion* 52 (5):953-62.
- Carp, Richard I., et Sharon M. Callahan. 1982. « Effect of Mouse Peritoneal Macrophages on Scrapie Infectivity during Extended in Vitro Incubation ». *Intervirology* 17 (4):201-7.
- Cartwright, Peter, Cameron McLean, Allan Sheppard, Duane Rivett, Karen Jones, et Stephen Dalton. 2005. « LIF/STAT3 Controls ES Cell Self-Renewal and Pluripotency by a Myc-Dependent Mechanism ». *Development (Cambridge, England)* 132 (5):885-96.
- Casaccia, P., A. Ladogana, Y. G. Xi, et M. Pocchiari. 1989. « Levels of Infectivity in the Blood throughout the Incubation Period of Hamsters Peripherally Injected with Scrapie ». *Archives of Virology* 108 (1-2):145-49.
- Casalone, Cristina, Gianluigi Zanusso, Pierluigi Acutis, Sergio Ferrari, Lorenzo Capucci, Fabrizio Tagliavini, Salvatore Monaco, et Maria Caramelli. 2004. « Identification of a Second Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy: Molecular Similarities with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9):3065-70.
- Cashman, N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton, et P. E. Bendheim. 1990. « Cellular Isoform of the Scrapie Agent Protein Participates in Lymphocyte Activation ». *Cell* 61 (1):185-92.
- Cassard, Hervé, Juan-Maria Torres, Caroline Lacroux, Jean-Yves Douet, Sylvie L. Benestad, Frédéric Lantier, Séverine Lugan, et al. 2014. « Evidence for Zoonotic Potential of Ovine Scrapie Prions ». *Nature Communications* 5 (12): 5821.
- Castilla, Joaquín, Paula Saá, et Claudio Soto. 2005. « Detection of Prions in Blood ». *Nature Medicine* 11 (9):982-85.
- Caughey, B., R. E. Race, D. Ernst, M. J. Buchmeier, et B. Chesebro. 1989. « Prion Protein Biosynthesis in Scrapie-Infected and Uninfected Neuroblastoma Cells ». *Journal of Virology* 63 (1):175-81.
- Caughey, B., et G. J. Raymond. 1993. « Sulfated Polyanion Inhibition of Scrapie-Associated PrP Accumulation in Cultured Cells ». *Journal of Virology* 67 (2):643-50.
- Caughey, B. W., A. Dong, K. S. Bhat, D. Ernst, S. F. Hayes, et W. S. Caughey. 1991. « Secondary Structure Analysis of the Scrapie-Associated Protein PrP 27-30 in Water by Infrared Spectroscopy ». *Biochemistry* 30 (31):7672-80.
- Caughey, Byron, et Gerald S. Baron. 2006. « Prions and Their Partners in Crime ». *Nature* 443 (7113):803-10.
- Cervenakova, Larisa, Sergey Akimov, Irina Vasilyeva, Oksana Yakovleva, Carroll McKenzie, Juraj Cervenak, Pedro Piccardo, et David M. Asher. 2011. « Fukuoka-1 Strain of Transmissible Spongiform Encephalopathy Agent Infects Murine Bone Marrow-Derived Cells with Features of Mesenchymal Stem Cells ». *Transfusion* 51 (8):1755-68.
- Cervenakova, Larisa, Oksana Yakovleva, Carroll McKenzie, Svetlana Kolchinsky, Lisa McShane, William N. Drohan, et Paul Brown. 2003. « Similar Levels of Infectivity in the Blood of Mice Infected with Human-Derived vCJD and GSS Strains of Transmissible Spongiform Encephalopathy ». *Transfusion* 43 (12):1687-94.
- Chaichana K., Guerrero-Cazares H., Capilla-Gonzalez V., Zamora-Berridi G., Achanta P., Gonzalez-Perez O., Jallo G.I., Garcia-Verdugo J.M., et Quinones-Hinojosa A. 2009. «Intra-Operatively Obtained Human Tissue: Protocols and Techniques for the Study of Neural Stem Cells ». *Journal of Neurosciences Methods*. 180(1): 116-125.

- Chadeau-Hyam, Marc, et Annick Alperovitch. 2005. « Risk of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in France ». *International Journal of Epidemiology* 34 (1):46-52.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, et Austin Smith. 2003. « Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 113 (5):643-55.
- Chandler, R. L. 1961. « Encephalopathy in Mice Produced by Inoculation with Scrapie Brain Material ». *Lancet (London, England)* 1 (7191):1378-79.
- Chandler, R. L. 1962. « Infection of Laboratory Animals with Mycobacterium Johnei. V. Further Studies on the Comparative Susceptibility of C57 Black Mice ». *Journal of Comparative Pathology* 72 (4):198-213.
- Chen, Chu-Chih, et Yin-Han Wang. 2014. « Estimation of the Exposure of the UK Population to the Bovine Spongiform Encephalopathy Agent through Dietary Intake during the Period 1980 to 1996 ». *PLoS One*. 9 (4).
- Chen, S. G., D. B. Teplow, P. Parchi, J. K. Teller, P. Gambetti, et L. Autilio-Gambetti. 1995. « Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (32):19173-80.
- Chen, Shugui, Satya P. Yadav, et Witold K. Surewicz. 2010. « Interaction between Human Prion Protein and Amyloid-Beta (A β) Oligomers: Role OF N-Terminal Residues ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (34):26377-83.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, et J. M. Keith. 1985. « Identification of Scrapie Prion Protein-Specific mRNA in Scrapie-Infected and Uninfected Brain ». *Nature* 315 (6017):331-33.
- Chiarini, Luciana B., Adriana R. O. Freitas, Silvio M. Zanata, Ricardo R. Brentani, Vilma R. Martins, et Rafael Linden. 2002. « Cellular Prion Protein Transduces Neuroprotective Signals ». *The EMBO Journal* 21 (13):3317-26.
- Chien, Kenneth R. 2008. « Regenerative Medicine and Human Models of Human Disease ». *Nature* 453 (7193):302-5.
- Choi, Hyun Woo, Jong Soo Kim, Sol Choi, Yean Ju Hong, Min Jung Kim, Han Geuk Seo, et Jeong Tae Do. 2014. « Neural Stem Cells Differentiated from iPS Cells Spontaneously Regain Pluripotency ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (10):2596-2604.
- Ciric, Danica, et Human Rezaei. 2015. « Biochemical Insight into the Prion Protein Family ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3:5.
- Clarke, Paul, et Azra C Ghani. 2005. « Projections of the future course of the primary vCJD epidemic in the UK: inclusion of subclinical infection and the possibility of wider genetic susceptibility ». *Journal of the Royal Society Interface* 2 (2):19-31.
- Clewley, Jonathan P., Carole M. Kelly, Nick Andrews, Kelly Vogliqi, Gary Mallinson, Maria Kaiser, David A. Hilton, et al. 2009. « Prevalence of Disease Related Prion Protein in Anonymous Tonsil Specimens in Britain: Cross Sectional Opportunistic Survey ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 338 (5): 1442.
- Cohen, C. H., et A. J. Valleron. 1999. « When Did Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Start? Implications on the Prediction of a New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease (nvCJD) Epidemic ». *International Journal of Epidemiology* 28 (3):526-31.
- Colby, David W., Rachel Wain, Ilia V. Baskakov, Giuseppe Legname, Christina G. Palmer, Hoang-Oanh B. Nguyen, Azucena Lemus, Fred E. Cohen, Stephen J. DeArmond, et Stanley B. Prusiner. 2010. « Protease-Sensitive Synthetic Prions ». *PLoS Pathogens* 6 (1).
- Collee, J. G., et R. Bradley. 1997. « BSE: A Decade on--Part I ». *Lancet (London, England)* 349 (9052):636-41.
- Collinge, J. 2005. « Molecular Neurology of Prion Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 76 (7):906-19.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey, et P. L. Lantos. 1995. « Unaltered Susceptibility to BSE in Transgenic Mice Expressing Human Prion Protein ». *Nature* 378 (6559):779-83.

- Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside, et A. F. Hill. 1996. « Molecular Analysis of Prion Strain Variation and the Aetiology of “New Variant” CJD ». *Nature* 383 (6602):685-90.
- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, et J. G. Jefferys. 1994. « Prion Protein Is Necessary for Normal Synaptic Function ». *Nature* 370 (6487):295-97.
- Collinge, John, et Anthony R. Clarke. 2007. « A General Model of Prion Strains and Their Pathogenicity ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5852):930-36.
- Collinge, John, Jerome Whitfield, Edward McKintosh, John Beck, Simon Mead, Dafydd J. Thomas, et Michael P. Alpers. 2006. « Kuru in the 21st Century--an Acquired Human Prion Disease with Very Long Incubation Periods ». *Lancet (London, England)* 367 (9528):2068-74.
- Collinge, John, Jerome Whitfield, Edward McKintosh, Adam Frosh, Simon Mead, Andrew F. Hill, Sebastian Brandner, Dafydd Thomas, et Michael P. Alpers. 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 of London. Series B, Biological Sciences* 363 (1510):3725-39.
- Collins, S. J., P. Sanchez-Juan, C. L. Masters, G. M. Klug, C. van Duijn, A. Poggi, M. Pocchiari, et al. 2006. « Determinants of Diagnostic Investigation Sensitivities across the Clinical Spectrum of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Brain: A Journal of Neurology*. 129 (9):2278-87.
- Collins, Steven J., Carolin Tumpach, Qiao-Xin Li, Victoria Lewis, Timothy M. Ryan, Blaine Roberts, Simon C. Drew, Victoria A. Lawson, et Cathryn L. Haigh. 2015. « The Prion Protein Regulates Beta-Amyloid-Mediated Self-Renewal of Neural Stem Cells in Vitro ». *Stem Cell Research & Therapy* 6 (4):60.
- Comoy, Emmanuel E., Cristina Casalone, Nathalie Lescoutra-Etcheagaray, Gianluigi Zanusso, Sophie Freire, Dominique Marcé, Frédéric Auvré, et al. 2008. « Atypical BSE (BASE) Transmitted from Asymptomatic Aging Cattle to a Primate ». *PLoS One*. 3 (8).
- Comoy, Emmanuel E., Jacqueline Mikol, Nina Jaffré, Vincent Lebon, Etienne Levavasseur, Nathalie Streichenberger, Chryslain Sumian, et al. 2017. « Experimental Transfusion of Variant CJD-Infected Blood Reveals Previously Uncharacterised Prion Disorder in Mice and Macaque ». *Nature Communications* 8 (1):1268.
- Comoy, Emmanuel E., Jacqueline Mikol, Sophie Luccantoni-Freire, Evelyne Correia, Nathalie Lescoutra-Etcheagaray, Valérie Durand, Capucine Dehen, et al. 2015. « Transmission of Scrapie Prions to Primate after an Extended Silent Incubation Period ». *Scientific Reports* 5 (6): 11573.
- Comoy, Emmanuel E., Jacqueline Mikol, Marie-Madeleine Ruchoux, Valérie Durand, Sophie Luccantoni-Freire, Capucine Dehen, Evelyne Correia, et al. 2013. « Evaluation of the Zoonotic Potential of Transmissible Mink Encephalopathy ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 2 (3):520-32.
- Concha-Marambio, Luis, Sandra Pritzkow, Fabio Moda, Fabrizio Tagliavini, James W. Ironside, Paul E. Schulz, et Claudio Soto. 2016. « Detection of Prions in Blood from Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Science Translational Medicine* 8 (370):370ra183.
- Cooper, Oliver, Hyemyung Seo, Shaida Andrabi, Cristina Guardia-Laguarta, John Graziotto, Maria Sundberg, Jesse R. McLean, et al. 2012. « Pharmacological Rescue of Mitochondrial Deficits in iPSC-Derived Neural Cells from Patients with Familial Parkinson’s Disease ». *Science Translational Medicine* 4 (141):141.
- Costa, Danielly C. F., Guilherme A. P. de Oliveira, Elio A. Cino, Iaci N. Soares, Luciana P. Rangel, et Jerson L. Silva. 2016. « Aggregation and Prion-Like Properties of Misfolded Tumor Suppressors: Is Cancer a Prion Disease? ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (10).
- Cotto, Emmanuelle, Michèle André, Jean Fogue, Hervé J. Fleury, et Patrick J. Babin. 2005. « Molecular Characterization, Phylogenetic Relationships, and Developmental Expression Patterns of Prion Genes in Zebrafish (Danio Rerio) ». *The FEBS Journal* 272 (2):500-513.
- Couquet, C., M. J. CORNUEJOLS, A. FREMONT, S. ALLIX, K. H. EL HACHIMI, K. T. ADJOU, M. O. OUIDJA, H. BRUGÈRE, et J. BRUGÈRE-PICOUX. 2005. « Observation of a maternal transmission of scrapie in sheep ». 2005.

- Court, L., et J. Bert. 1995. « Electrophysiology of transmissible encephalopathies ». *Pathologie-Biologie* 43 (1):25-42.
- Cousens, S. N., E. Vynnycky, M. Zeidler, R. G. Will, et P. G. Smith. 1997. « Predicting the CJD Epidemic in Humans ». *Nature* 385 (6613):197-98.
- Cramm, Maria, Matthias Schmitz, André Karch, Eva Mitrova, Franziska Kuhn, Bjoern Schroeder, Alex Raeber, et al. 2016. « Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Molecular Neurobiology* 53 (3):1896-1904.
- Cramm, Maria, Matthias Schmitz, André Karch, Saima Zafar, Daniela Varges, Eva Mitrova, Bjoern Schroeder, Alex Raeber, Franziska Kuhn, et Inga Zerr. 2015. « Characteristic CSF Prion Seeding Efficiency in Humans with Prion Diseases ». *Molecular Neurobiology* 51 (1):396-405.
- Criado, José R., Manuel Sánchez-Alavez, Bruno Conti, Jeannie L. Giacchino, Derek N. Wills, Steven J. Henriksen, Richard Race, Jean C. Manson, Bruce Chesebro, et Michael B. A. Oldstone. 2005. « Mice Devoid of Prion Protein Have Cognitive Deficits That Are Rescued by Reconstitution of PrP in Neurons ». *Neurobiology of Disease* 19 (1-2):255-65.
- Cronier S., Beringue V., Bellon A., Peyrin J.M., et Laude H. 2007. « Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures ». *Journal of Virology* 81(24).
- Csobonyeiova, Maria, Stefan Polak, Radoslav Zamborsky, et Lubos Danisovic. 2017. « iPS cell technologies and their prospect for bone regeneration and disease modeling: A mini review ». *Journal of Advanced Research* 8 (4):321-27.
- Cuillé, et Chelle. 1936. « La maladie dite tremblante du mouton est inoculable? » *Comptes rendus séances académie Sciences*, 1936.
- Daude, Nathalie, Serene Wohlgemuth, Rebecca Brown, Rose Pitstick, Hristina Gapeshtina, Jing Yang, George A. Carlson, et David Westaway. 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):9035-40.
- Davidson, L. R. R., C. A. Llewelyn, J. M. Mackenzie, P. E. Hewitt, et R. G. Will. 2014. « Variant CJD and Blood Transfusion: Are There Additional Cases? » *Vox Sanguinis* 107 (3):220-25.
- Davies, Paul, et David R. Brown. 2008. « The Chemistry of Copper Binding to PrP: Is There Sufficient Evidence to Elucidate a Role for Copper in Protein Function? » *The Biochemical Journal* 410 (2):237-44.
- Davies, P. 2009. « Manganese Enhances Prion Protein Survival in Model Soils and Increases Prion Infectivity to Cells ». *PloS One* 4 (10):e7518.
- Deleault, Nathan R., Ralf W. Lucassen, et Surachai Supattapone. 2003. « RNA Molecules Stimulate Prion Protein Conversion ». *Nature* 425 (6959):717-20.
- Deslys, Jean-Philippe, et André Picot. 2001. *La vache folle: les risques pour l'homme*. Flammarion.
- Detwiler, L. A., et M. Baylis. 2003. « The Epidemiology of Scrapie ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 22 (1):121-43.
- Dexter, Glenda, Sue C. Tongue, Lindsay Heasman, Susan J. Bellworthy, Andrew Davis, S. Jo Moore, Marion M. Simmons, A. Robin Sayers, Hugh A. Simmons, et Danny Matthews. 2009. « The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock ». *BMC Veterinary Research* 5 (10): 38.
- Diack, Abigail B., Aileen Boyle, Diane Ritchie, Chris Plinston, Dorothy Kisielewski, Jesús de Pedro-Cuesta, Alberto Rábano, Robert G. Will, et Jean C. Manson. 2017. « Similarities of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Strain in Mother and Son in Spain to UK Reference Case ». *Emerging Infectious Diseases* 23 (9):1593-96.
- Diack, Abigail B., Diane L. Ritchie, Alexander H. Peden, Deborah Brown, Aileen Boyle, Laura Morabito, David MacLennan, et al. 2014. « Variably Protease-Sensitive Prionopathy, a Unique Prion Variant with Inefficient Transmission Properties ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (12):1969-79.

- Dickinson, A. G. 1975. « Host-Pathogen Interactions in Scrapie ». *Genetics* 79: 387-95.
- Dickinson, A. G., et D. M. Taylor. 1978. « Resistance of Scrapie Agent to Decontamination ». *The New England Journal of Medicine* 299 (25):1413-14.
- Diringer, H. 1984. « Sustained Viremia in Experimental Hamster Scrapie. Brief Report ». *Archives of Virology* 82 (1-2):105-9.
- Dodelet, V. C., et N. R. Cashman. 1998. « Prion Protein Expression in Human Leukocyte Differentiation ». *Blood* 91 (5):1556-61.
- Donaldson, D. S., A. Kobayashi, H. Ohno, H. Yagita, I. R. Williams, et N. A. Mabbott. 2012. « M Cell-Depletion Blocks Oral Prion Disease Pathogenesis ». *Mucosal Immunology* 5 (2):216-25.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, et H. J. Dyson. 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):13452-57.
- Dorey, Aline, Yannick Tholance, Alain Vighetto, Armand Perret-Liaudet, Ingolf Lachman, Pierre Krolak-Salmon, Uta Wagner, et al. 2015. « Association of Cerebrospinal Fluid Prion Protein Levels and the Distinction between Alzheimer Disease and Creutzfeldt-Jakob Disease ». *JAMA Neurology* 72 (3):267-75.
- Dudas, Sandor, Jace James, Renee Anderson, et Stefanie Czub. 2015. « Exploring the Cause of Initially Reactive Bovine Brains on Rapid Tests for BSE ». *Prion* 9 (6):429-43.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten, et D. Cowen. 1974. « Letter: Possible Person-to-Person Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease ». *The New England Journal of Medicine* 290 (12):692-93.
- Economopoulos V., J.C. Noad, S. Krishnamoorthy, B. K. Rutt, et P. J. Foster. 2011. « Comparing the MRI Appearance of the Lymph Nodes and Spleen in Wild-Type and Immuno-Deficient Mouse Strains ». *Plos One*.
- Edgeworth, Julie Ann, Michael Farmer, Anita Sicilia, Paul Tavares, Jonathan Beck, Tracy Campbell, Jessica Lowe, et al. 2011. « Detection of Prion Infection in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: A Blood-Based Assay ». *Lancet (London, England)* 377 (9764):487-93.
- Eiraku, Mototsugu, et Yoshiki Sasai. 2011. « Mouse Embryonic Stem Cell Culture for Generation of Three-Dimensional Retinal and Cortical Tissues ». *Nature Protocols* 7 (1):69-79.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, et F. H. Gage. 1998. « Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus ». *Nature Medicine* 4 (11):1313-17.
- Espinosa, Juan Carlos, María Eugenia Herva, Olivier Andréoletti, Danielle Padilla, Caroline Lacroux, Hervé Cassard, Isabelle Lantier, Joaquin Castilla, et Juan Maria Torres. 2009. « Transgenic Mice Expressing Porcine Prion Protein Resistant to Classical Scrapie but Susceptible to Sheep Bovine Spongiform Encephalopathy and Atypical Scrapie ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (8):1214-21.
- Esteban, Miguel A., Meixiu Peng, Zhang Deli, Jie Cai, Jiayin Yang, Jianyong Xu, Liangxue Lai, et Duanqing Pei. 2010. « Porcine Induced Pluripotent Stem Cells May Bridge the Gap between Mouse and Human iPS ». *IUBMB Life* 62 (4):277-82.
- Faucheux, B. A., E. Morain, V. Diouron, J.-P. Brandel, D. Salomon, V. Sazdovitch, N. Privat, J.-L. Laplanche, J.-J. Hauw, et S. Haïk. 2011. « Quantification of Surviving Cerebellar Granule Neurons and Abnormal Prion Protein (PrP^{Sc}) Deposition in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Supports a Pathogenic Role for Small PrP^{Sc} Deposits Common to the Various Molecular Subtypes ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 37 (5):500-512.
- Fediaevsky, Alexandre, Sue C. Tongue, Maria Nöremark, Didier Calavas, Giuseppe Ru, et Petter Hopp. 2008. « A Descriptive Study of the Prevalence of Atypical and Classical Scrapie in Sheep in 20 European Countries ». *BMC Veterinary Research* 4 (6): 19.
- Ferrer, I., B. Puig, R. Blanco, et E. Martí. 2000. « Prion Protein Deposition and Abnormal Synaptic Protein Expression in the Cerebellum in Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Neuroscience* 97 (4):715-26.

- Fevrier, Benoit, Didier Vilette, Fabienne Archer, Damarys Loew, Wolfgang Faigle, Michel Vidal, Hubert Laude, et Graça Raposo. 2004. « Cells Release Prions in Association with Exosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26):9683-88.
- Fichet, Guillaume, Emmanuel Comoy, Christelle Duval, Kathleen Antloga, Capucine Dehen, Aurore Charbonnier, Gerald McDonnell, Paul Brown, Corinne Ida Lasmézas, et Jean-Philippe Deslys. 2004. « Novel Methods for Disinfection of Prion-Contaminated Medical Devices ». *Lancet (London, England)* 364 (9433):521-26.
- Flechsig, E., I. Hegyi, M. Enari, P. Schwarz, J. Collinge, et C. Weissmann. 2001. « Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. » *Molecular Medicine* 7 (10):679-84.
- Fluharty, Brian R., Emiliano Biasini, Matteo Stravalaci, Alessandra Scip, Luisa Diomede, Claudia Balducci, Pietro La Vitola, et al. 2013. « An N-terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid- β Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (11):7857-66.
- Follet, Jérôme, Catherine Lemaire-Vieille, Françoise Blanquet-Grossard, Valérie Podevin-Dimster, Sylvain Lehmann, Jean-Paul Chauvin, Jean-Pierre Decavel, et al. 2002. « PrP Expression and Replication by Schwann Cells: Implications in Prion Spreading ». *Journal of Virology* 76 (5):2434-39.
- Ford, M. J., L. J. Burton, H. Li, C. H. Graham, Y. Frobert, J. Grassi, S. M. Hall, et R. J. Morris. 2002. « A Marked Disparity between the Expression of Prion Protein and Its Message by Neurones of the CNS ». *Neuroscience* 111 (3):533-51.
- Fraser, H., K. L. Brown, K. Stewart, I. McConnell, P. McBride, et A. Williams. 1996. « Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow ». *Journal of General Virology* 77 (8):1935-40.
- Fraser, H., et A. G. Dickinson. 1973. « Scrapie in Mice. Agent-Strain Differences in the Distribution and Intensity of Grey Matter Vacuolation ». *Journal of Comparative Pathology* 83 (1):29-40.
- Frosh, Adam, Lorraine C. Smith, Carl J. Jackson, Jacqueline M. Linehan, Sebastian Brandner, Jonathan D. F. Wadsworth, et John Collinge. 2004. « Analysis of 2000 Consecutive UK Tonsillectomy Specimens for Disease-Related Prion Protein ». *Lancet (London, England)* 364 (9441):1260-62.
- Fusaki, Noemi, Hiroshi Ban, Akiyo Nishiyama, Koichi Saeki, et Mamoru Hasegawa. 2009. « Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into the Host Genome ». *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 85 (8):348-62.
- Gajdusek, D. C. 1973. « Kuru and Creutzfeldt-Jakob Disease. Experimental Models of Noninflammatory Degenerative Slow Virus Disease of the Central Nervous System ». *Annals of Clinical Research* 5 (5):254-61.
- Gajdusek, D. C., et C. J. Gibbs. 1976. « Letter: Survival of Creutzfeldt-Jakob-Disease Virus in Formol-Fixed Brain Tissue ». *The New England Journal of Medicine* 294 (10):553.
- Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs, et M. Alpers. 1966. « Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees ». *Nature* 209 (5025):794-96.
- Gajdusek, D. C. 1967. « Transmission and Passage of Experimental "kuru" to Chimpanzees ». *Science (New York, N.Y.)* 155 (3759):212-14.
- Gambetti, Pierluigi, Zhiqian Dong, Jue Yuan, Xiangzhu Xiao, Mengjie Zheng, Amer Alsheklee, Rudy Castellani, et al. 2008. « A Novel Human Disease with Abnormal Prion Protein Sensitive to Protease ». *Annals of Neurology* 63 (6):697-708.
- Gambetti, Pierluigi, Qingzhong Kong, Wenquan Zou, Piero Parchi, et Shu G. Chen. 2003. « Sporadic and Familial CJD: Classification and Characterisation ». *British Medical Bulletin* 66:213-39.
- Garcez, Patricia P., Erick Correia Loiola, Rodrigo Madeiro da Costa, Luiza M. Higa, Pablo Trindade, Rodrigo Delvecchio, Juliana Minardi Nascimento, Rodrigo Brindeiro, Amilcar Tanuri, et Stevens K. Rehen. 2016. « Zika Virus Impairs Growth in Human Neurospheres and Brain Organoids ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6287):816-18.

- Garske, Tini, et Azra C. Ghani. 2010. « Uncertainty in the Tail of the Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Epidemic in the UK ». *PloS One* 5 (12).
- Gasperini, Lisa, et Giuseppe Legname. 2014. « Prion Protein and Aging ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2:44.
- Gasperini, Lisa, Elisa Meneghetti, Beatrice Pastore, Federico Benetti, et Giuseppe Legname. 2015. « Prion Protein and Copper Cooperatively Protect Neurons by Modulating NMDA Receptor through S-Nitrosylation ». *Antioxidants & Redox Signaling* 22 (9):772-84.
- Gauczynski, S., C. Hundt, C. Leucht, et S. Weiss. 2001. « Interaction of Prion Proteins with Cell Surface Receptors, Molecular Chaperones, and Other Molecules ». *Advances in Protein Chemistry* 57:229-72.
- Ghaemmaghami, Sina, Puay-Wah Phuan, Beth Perkins, Julie Ullman, Barnaby C. H. May, Fred E. Cohen, et Stanley B. Prusiner. 2007. « Cell Division Modulates Prion Accumulation in Cultured Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (46):17971-76.
- Ghani, A. C., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, et R. M. Anderson. 2000. « Assessment of the Prevalence of vCJD through Testing Tonsils and Appendices for Abnormal Prion Protein ». *Proceedings. Biological Sciences* 267 (1438):23-29.
- Ghani, Azra C., Christl A. Donnelly, Neil M. Ferguson, et Roy M. Anderson. 2003a. « Updated Projections of Future vCJD Deaths in the UK ». *BMC Infectious Diseases* 3: 4.
- Ghani, A. C. 2003b. « Updated Projections of Future vCJD Deaths in the UK ». *BMC Infectious Diseases* 3: 4.
- Gibbs, C. J., H. L. Amyx, A. Bacote, C. L. Masters, et D. C. Gajdusek. 1980. « Oral Transmission of Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease, and Scrapie to Nonhuman Primates ». *The Journal of Infectious Diseases* 142 (2):205-8.
- Gibbs, C. J., D. M. Asher, A. Kobrine, H. L. Amyx, M. P. Sulima, et D. C. Gajdusek. 1994. « Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease to a Chimpanzee by Electrodes Contaminated during Neurosurgery ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 57 (6):757-58.
- Gibbs, C. J., et D. C. Gajdusek. 1970. « Kuru: Pathogenesis and Characterization of Virus ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19 (1):138-45.
- Gibbs, C. J., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel, et W. B. Matthews. 1968. « Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee ». *Science (New York, N.Y.)* 161 (3839):388-89.
- Giese, A., D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist, et H. A. Kretzschmar. 1998. « Role of Microglia in Neuronal Cell Death in Prion Disease ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8 (3):449-57.
- Gill, O. Noel, Yvonne Spencer, Angela Richard-Loendt, Carole Kelly, Reza Dabaghian, Lynnette Boyes, Jacqueline Linehan, et al. 2013. « Prevalent Abnormal Prion Protein in Human Appendixes after Bovine Spongiform Encephalopathy Epizootic: Large Scale Survey ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 347 (10).
- Gillies, M., G. Chohan, C. A. Llewelyn, J. MacKenzie, H. J. T. Ward, P. E. Hewitt, et R. G. Will. 2009. « A Retrospective Case Note Review of Deceased Recipients of vCJD-Implicated Blood Transfusions ». *Vox Sanguinis* 97 (3):211-18.
- Giri, Ranjit K., Rebecca Young, Rose Pitstick, Stephen J. DeArmond, Stanley B. Prusiner, et George A. Carlson. 2006. « Prion infection of mouse neurospheres ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10):3875-80.
- Glatzel, Markus, Eugenio Abela, Manuela Maissen, et Adriano Aguzzi. 2003. « Extraneural Pathologic Prion Protein in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *The New England Journal of Medicine* 349 (19):1812-20.
- Glier, Hana, Jan Simak, Martin Panigaj, Monique P. Gelderman, Jaroslav G. Vostal, et Karel Holada. 2015. « Expression of the Cellular Prion Protein Affects Posttransfusion Recovery and Survival of Red Blood Cells in Mice ». *Transfusion* 55 (11):2590-96.

- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, et L. James. 1991. « Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease ». *Nature* 349 (6311):704-6.
- Goldgaber, D., L. G. Goldfarb, P. Brown, D. M. Asher, W. T. Brown, S. Lin, J. W. Teener, S. M. Feinstone, R. Rubenstein, et R. J. Kascsak. 1989. « Mutations in Familial Creutzfeldt-Jakob Disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's Syndrome ». *Experimental Neurology* 106 (2):204-6.
- Gómez-Nicola D., Fransen N.L., Suzzi S., et Perry V.H. 2013. « Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration ». *Journal of Neurosciences*. 33(6): 2481-93.
- Goold, R., S. Rabbanian, L. Sutton, R. Andre, P. Arora, J. Moonga, A. R. Clarke, et al. 2011. « Rapid Cell-Surface Prion Protein Conversion Revealed Using a Novel Cell System ». *Nature Communications* 2:281.
- Gore, S. M. 1997. « Commentary: age related exposure of patients to the agent of BSE should not be downplayed. » *BMJ : British Medical Journal* 315 (7105):395-96.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, et al. 2000. « Cellular Prion Protein Binds Laminin and Mediates Neuritogenesis ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 76 (1):85-92.
- Grassmann, Andrea, Hanna Wolf, Julia Hofmann, James Graham, et Ina Vorberg. 2013. « Cellular Aspects of Prion Replication in Vitro ». *Viruses* 5 (1):374-405.
- Gray, F., F. Chrétien, H. Adle-Biassette, A. Dorandeu, T. Ereau, M. B. Delisle, N. Kopp, J. W. Ironside, et C. Vital. 1999. « Neuronal Apoptosis in Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (4):321-28.
- Greenfield, Brian, Charles Larson, Lily Hechtman, Cecile Rousseau, et Robert Platt. 2002. « A Rapid-Response Outpatient Model for Reducing Hospitalization Rates among Suicidal Adolescents ». *Psychiatric Services (Washington, D.C.)* 53 (12):1574-79.
- Gregori, L., J.-A. Maring, C. MacAuley, B. Dunston, M. Rentsch, C. Kempf, et R. G. Rohwer. 2004. « Partitioning of TSE Infectivity during Ethanol Fractionation of Human Plasma ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 32 (1):1-10.
- Gregori, Luisa, Patrick V. Gurgel, Julia T. Lathrop, Peter Edwardson, Brian C. Lambert, Ruben G. Carbonell, Steven J. Burton, David J. Hammond, et Robert G. Rohwer. 2006. « Reduction in Infectivity of Endogenous Transmissible Spongiform Encephalopathies Present in Blood by Adsorption to Selective Affinity Resins ». *Lancet (London, England)* 368 (9554):2226-30.
- Griffith, J. S. 1967. « Self-Replication and Scrapie ». *Nature* 215 (5105):1043-44.
- Groschup, Martin H., et Anne Buschmann. 2008. « Rodent Models for Prion Diseases ». *Veterinary Research* 39 (4):32.
- Groschup, Martin H., Caroline Lacroux, Anne Buschmann, Gesine Lühken, Jacinthe Mathey, Martin Eiden, Séverine Lukan, et al. 2007. « Classic Scrapie in Sheep with the ARR/ARR Prion Genotype in Germany and France ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (8):1201-7.
- Grskovic, Marica, Christina Chaivorapol, Alexandre Gaspar-Maia, Hao Li, et Miguel Ramalho-Santos. 2007. « Systematic Identification of Cis-Regulatory Sequences Active in Mouse and Human Embryonic Stem Cells ». *PLoS Genetics* 3 (8).
- Grskovic, Marica, Ashkan Javaherian, Berta Strulovici, et George Q. Daley. 2011. « Induced Pluripotent Stem Cells--Opportunities for Disease Modelling and Drug Discovery ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 10 (12):915-29.
- Guillot-Sestier, Marie-Victoire, Claire Sunyach, Charlotte Druon, Sabine Scarzello, et Frédéric Checler. 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):35973-86.
- Guillot-Sestier, Marie-Victoire, Claire Sunyach, Sergio T. Ferreira, Maria-Paz Marzolo, Charlotte Bauer, Aurélie Thevenet, et Frédéric Checler. 2012. « α -Secretase-derived Fragment of

- Cellular Prion, N1, Protects against Monomeric and Oligomeric Amyloid β ($A\beta$)-associated Cell Death ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (7):5021-32.
- Gurdon, J. B. 1962. « The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 10 (12):622-40.
- Gutierrez-Aranda, Ivan, Veronica Ramos-Mejia, Clara Bueno, Martin Munoz-Lopez, Pedro J Real, Angela Mácia, Laura Sanchez, Gertrudis Ligeró, Jose L Garcia-Parez, et Pablo Menendez. 2010. « Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (9):1568-70.
- Hachimi EL K.H., Chaunu M.P., Cervanokova L., Brown P., Foncin J.F. 1997. « Transmission interhumaine neurochirurgicale ». *Science* 320: 319-328.
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy, et R. E. Race. 1982. « Natural Infection of Suffolk Sheep with Scrapie Virus ». *The Journal of Infectious Diseases* 146 (5):657-64.
- Hadlow WJ. 1961. « The pathology of experimental scrapie in the dairy goat ». *Research in veterinary science*, 289-314.
- Haeberlé, A. M., C. Ribaut-Barassin, G. Bombarde, J. Mariani, G. Hunsmann, J. Grassi, et Y. Bailly. 2000. « Synaptic Prion Protein Immuno-Reactivity in the Rodent Cerebellum ». *Microscopy Research and Technique* 50 (1):66-75.
- Haigh, Cathryn L. 2017. « Cellular Analysis of Adult Neural Stem Cells for Investigating Prion Biology ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1658:133-45.
- Haïk, Stéphane, Didier Dormont, Baptiste A. Faucheux, Claude Marsault, et Jean-Jacques Hauw. 2002. « Prion Protein Deposits Match Magnetic Resonance Imaging Signal Abnormalities in Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Annals of Neurology* 51 (6):797-99.
- Haïk, Stéphane, Baptiste A. Faucheux, Véronique Szdovitch, Nicolas Privat, Jean-Louis Kemeny, Armand Perret-Liaudet, et Jean-Jacques Hauw. 2003. « The Sympathetic Nervous System Is Involved in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Nature Medicine* 9 (9): 1121-23.
- Halliez, Sophie, Bruno Passet, Séverine Martin-Lannerée, Julia Hernandez-Rapp, Hubert Laude, Sophie Mouillet-Richard, Jean-Luc Vilotte, et Vincent Béringue. 2014. « To Develop with or without the Prion Protein ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2:58.
- Hamlin, Clive, Gianfranco Puoti, Sally Berri, Elliott Sting, Carrie Harris, Mark Cohen, Charles Spear, Alberto Bizzi, Sara M. Debanne, et Douglas Y. Rowland. 2012. « A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease ». *Neurology* 79 (6):547-52.
- Hannaoui, Samia, Sara Amidian, Yo Ching Cheng, Camilo Duque Velásquez, Lyudmyla Dorosh, Sampson Law, Glenn Telling, et al. 2017. « Destabilizing Polymorphism in Cervid Prion Protein Hydrophobic Core Determines Prion Conformation and Conversion Efficiency ». *PLoS Pathogens* 13 (8).
- Hannaoui, Samia, Layal Maatouk, Nicolas Privat, Etienne Levavasseur, Baptiste A. Faucheux, et Stéphane Haïk. 2013. « Prion Propagation and Toxicity Occur in Vitro with Two-Phase Kinetics Specific to Strain and Neuronal Type ». *Journal of Virology* 87 (5):2535-48.
- Hannaoui, Samia, Su Yeon Shim, Yo Ching Cheng, Erica Corda, et Sabine Gilch. 2014. « Cholesterol Balance in Prion Diseases and Alzheimer's Disease ». *Viruses* 6 (11):4505-35.
- Hansen, H. C., S. Zschocke, H. J. Stürenburg, et K. Kunze. 1998. « Clinical Changes and EEG Patterns Preceding the Onset of Periodic Sharp Wave Complexes in Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Acta Neurologica Scandinavica* 97 (2):99-106.
- Hartsough, G. R., et D. Burger. 1965. « Encephalopathy of Mink. I. Epizootiologic and Clinical Observations ». *The Journal of Infectious Diseases* 115 (4):387-92.
- Head, M. W., R. Knight, M. Zeidler, H. Yull, A. Barlow, et J. W. Ironside. 2009. « A Case of Protease Sensitive Prionopathy in a Patient in the UK ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35 (6):628-32.
- Head, Mark W. 2013. « Human Prion Diseases: Molecular, Cellular and Population Biology ». *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 33 (3):221-36.

- Head, Mark W., Suzanne Lowrie, Gurjit Chohan, Richard Knight, David J. Scoones, et James W. Ironside. 2010. « Variably Protease-Sensitive Prionopathy in a PRNP Codon 129 Heterozygous UK Patient with Co-Existing Tau, α Synuclein and A β Pathology ». *Acta Neuropathologica* 120 (6):821-23.
- Head, Mark W., Helen M. Yull, Diane L. Ritchie, Jan P. Langeveld, Nicholas A. Fletcher, Richard S. Knight, et James W. Ironside. 2013. « Variably Protease-Sensitive Prionopathy in the UK: A Retrospective Review 1991-2008 ». *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 4):1102-15.
- Hedges, Erin C., Vera J. Mehler, et Agnes L. Nishimura. 2016. « The Use of Stem Cells to Model Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia: From Basic Research to Regenerative Medicine ». Research article. *Stem Cells International*. 2016.
- Henderson, Davin M., Nathaniel D. Denkers, Clare E. Hoover, Nina Garbino, Candace K. Mathiason, et Edward A. Hoover. 2015. « Longitudinal Detection of Prion Shedding in Saliva and Urine by Chronic Wasting Disease-Infected Deer by Real-Time Quaking-Induced Conversion ». *Journal of Virology* 89 (18):9338-47.
- Hennessy E., Griffin É.W. Cunningham C. 2015. « Astrocytes Are Primed by Chronic Neurodegeneration to Produce Exaggerated Chemokine and Cell Infiltration Responses to Acute Stimulation with the Cytokines IL-1 β and TNF- α ». *Journal of Neurosciences*. 35(22): 8411-22.
- Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl, et A. Aguzzi. 2001. « Transepithelial Prion Transport by M Cells ». *Nature Medicine* 7 (9):976-77.
- Herbst, Allen, Pamela Banser, Camilo Duque Velasquez, Charles E. Mays, Valerie L. Sim, David Westaway, Judd M. Aiken, et Debbie McKenzie. 2013. « Infectious Prions Accumulate to High Levels in Non Proliferative C2C12 Myotubes ». *PLoS Pathogens* 9 (11).
- Herms, J., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schürmann, O. Windl, N. Brose, et H. Kretschmar. 1999. « Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (20):8866-75.
- Herva, Maria Eugenia, Aroa Relaño-Ginés, Ana Villa, et Juan María Torres. 2010. « Prion Infection of Differentiated Neurospheres ». *Journal of Neuroscience Methods* 188 (2):270-75.
- Herzog, C., N. Salès, N. Etchegaray, A. Charbonnier, S. Freire, D. Dormont, J.-P. Deslys, et C. I. Lasmézas. 2004. « Tissue Distribution of Bovine Spongiform Encephalopathy Agent in Primates after Intravenous or Oral Infection ». *Lancet (London, England)* 363 (9407):422-28.
- Hill, A. F., R. J. Butterworth, S. Joiner, G. Jackson, M. N. Rossor, D. J. Thomas, A. Frosh, et al. 1999. « Investigation of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Other Human Prion Diseases with Tonsil Biopsy Samples ». *Lancet (London, England)* 353 (9148):183-89.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey, et P. Lantos. 1997. « The Same Prion Strain Causes vCJD and BSE ». *Nature* 389 (6650):448-50, 526.
- Hill, A. F., M. Zeidler, J. Ironside, et J. Collinge. 1997. « Diagnosis of New Variant Creutzfeldt-Jakob Disease by Tonsil Biopsy ». *Lancet (London, England)* 349 (9045):99-100.
- Hill, Andrew F., Susan Joiner, Jonathan D. F. Wadsworth, Katie C. L. Sidle, Jeanne E. Bell, Herbert Budka, James W. Ironside, et John Collinge. 2003. « Molecular Classification of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Brain: A Journal of Neurology* 126 (Pt 6):1333-46.
- Hilton, D. A., E. Fathers, P. Edwards, J. W. Ironside, et J. Zajicek. 1998. « Prion Immunoreactivity in Appendix before Clinical Onset of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Lancet (London, England)* 352 (9129):703-4.
- Hilton, David A., Azra C. Ghani, Lisa Conyers, Philip Edwards, Linda McCardle, Mark Penney, Diane Ritchie, et James W. Ironside. 2002. « Accumulation of Prion Protein in Tonsil and Appendix: Review of Tissue Samples ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 325 (7365):633-34.
- Hilton, David A., Azra C. Ghani, Lisa Conyers, Philip Edwards, Linda McCardle, Diane Ritchie, Mark Penney, Doha Hegazy, et James W. Ironside. 2004. « Prevalence of Lymphoreticular Prion Protein Accumulation in UK Tissue Samples ». *The Journal of Pathology* 203 (3):733-39.

- Hirose, Kazunori, Yasushi Iwasaki, Masayuki Izumi, Mari Yoshida, Yoshio Hashizume, Tetsuyuki Kitamoto, et Ko Sahashi. 2006. « MM2-Thalamic-Type Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease with Widespread Neocortical Pathology ». *Acta Neuropathologica* 112 (4):503-11.
- Holada, K., T. H. Mondoro, J. Muller, et J. G. Vostal. 1998. « Increased Expression of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Resistant Prion Proteins on the Surface of Activated Platelets ». *British Journal of Haematology* 103 (1):276-82.
- Holada, Karel, Jan Simak, Antonio M. Risitano, Jaroslaw Maciejewski, Neal S. Young, et Jaroslav G. Vostal. 2002. « Activated Platelets of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Express Cellular Prion Protein ». *Blood* 100 (1):341-43.
- Holman, Robert C., Ermias D. Belay, Krista Y. Christensen, Ryan A. Maddox, Arialdi M. Minino, Arianne M. Folkema, Dana L. Haberling, et al. 2010. « Human Prion Diseases in the United States ». *PloS One* 5 (1).
- Hornabrook, R. W. 1968. « Kuru--a Subacute Cerebellar Degeneration. The Natural History and Clinical Features ». *Brain: A Journal of Neurology* 91 (1):53-74.
- Houston, F., J. D. Foster, A. Chong, N. Hunter, et C. J. Bostock. 2000. « Transmission of BSE by Blood Transfusion in Sheep ». *Lancet (London, England)* 356 (9234):999-1000.
- Houston, Fiona, Sandra McCutcheon, Wilfred Goldmann, Angela Chong, James Foster, Silvia Sisó, Lorenzo González, Martin Jeffrey, et Nora Hunter. 2008. « Prion Diseases Are Efficiently Transmitted by Blood Transfusion in Sheep ». *Blood* 112 (12):4739-45.
- Hsiao, K., H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott, et S. B. Prusiner. 1989. « Linkage of a Prion Protein Missense Variant to Gerstmann-Sträussler Syndrome ». *Nature* 338 (6213):342-45.
- Hsich, G., K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee, et M. G. Harrington. 1996. « The 14-3-3 Brain Protein in Cerebrospinal Fluid as a Marker for Transmissible Spongiform Encephalopathies ». *The New England Journal of Medicine* 335 (13):924-30.
- Huang, Z., S. B. Prusiner, et F. E. Cohen. 1996. « Structures of Prion Proteins and Conformational Models for Prion Diseases ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 207:49-67.
- Huangfu, Danwei, Kenji Osafune, René Maehr, Wenjun Guo, Astrid Eijkelenboom, Shuibing Chen, Whitney Muhlestein, et Douglas A. Melton. 2008. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Primary Human Fibroblasts with Only Oct4 and Sox2 ». *Nature Biotechnology* 26 (11):1269-75.
- Huillard d'Aignaux, J., D. Costagliola, J. Maccario, T. Billette de Villemeur, J. P. Brandel, J. P. Deslys, J. J. Hauw, et al. 1999. « Incubation Period of Creutzfeldt-Jakob Disease in Human Growth Hormone Recipients in France ». *Neurology* 53 (6):1197-1201.
- Hunter, G. D., et G. C. Millson. 1964. « STUDIES ON THE HEAT STABILITY AND CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF THE SCRAPIE AGENT ». *Journal of General Microbiology* 37 (11): 251-58.
- Hunter, N., L. Moore, B. D. Hosie, W. S. Dingwall, et A. Greig. 1997. « Association between Natural Scrapie and PrP Genotype in a Flock of Suffolk Sheep in Scotland ». *The Veterinary Record* 140 (3):59-63.
- Hunter, Nora, James Foster, Angela Chong, Sandra McCutcheon, David Parnham, Samantha Eaton, Calum MacKenzie, et Fiona Houston. 2002. « Transmission of Prion Diseases by Blood Transfusion ». *The Journal of General Virology* 83 (Pt 11):2897-2905.
- Ironside, J. W. 2006. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Risk of Transmission by Blood Transfusion and Blood Therapies ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 12 Suppl 1 (3):8-15.
- Ironside, J. W., et M. W. Head. 2004. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Risk of Transmission by Blood and Blood Products ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 10 Suppl 4 (10):64-69.
- Ironside, James W., Matthew T. Bishop, Kelly Connolly, Doha Hegazy, Suzanne Lowrie, Margaret Le Grice, Diane L. Ritchie, Linda M. McCardle, et David A. Hilton. 2006. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Prion Protein Genotype Analysis of Positive Appendix Tissue Samples from a Retrospective Prevalence Study ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 332 (7551):1186-88.

- Isaacs, J. D., G. S. Jackson, et D. M. Altmann. 2006. « The Role of the Cellular Prion Protein in the Immune System ». *Clinical and Experimental Immunology* 146 (1):1-8.
- Ishikawa, Fumihiko, Masaki Yasukawa, Bonnie Lyons, Shuro Yoshida, Toshihiro Miyamoto, Goichi Yoshimoto, Takeshi Watanabe, Koichi Akashi, Leonard D. Shultz, et Mine Harada. 2005. « Development of Functional Human Blood and Immune Systems in NOD/SCID/IL2 Receptor {gamma} Chain(null) Mice ». *Blood* 106 (5):1565-73.
- Israel, Mason A., Shauna H. Yuan, Cedric Bardy, Sol M. Reyna, Yangling Mu, Cheryl Herrera, Michael P. Hefferan, et al. 2012. « Probing Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 482 (7384):216-20.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, et N. Benvenisty. 2000. « Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6 (2):88-95.
- Iwamaru, Yoshifumi, Takato Takenouchi, Morikazu Imamura, Yoshihisa Shimizu, Kohtaro Miyazawa, Shirou Mohri, Takashi Yokoyama, et Hiroshi Kitani. 2013. « Prion Replication Elicits Cytopathic Changes in Differentiated Neurosphere Cultures ». *Journal of Virology* 87 (15):8745-55.
- Iwamaru, Yoshifumi, Takato Takenouchi, Kazumasa Ogihara, Megumi Hoshino, Masuhiro Takata, Morikazu Imamura, Yuichi Tagawa, et al. 2007. « Microglial Cell Line Established from Prion Protein-Overexpressing Mice Is Susceptible to Various Murine Prion Strains ». *Journal of Virology* 81 (3):1524-27.
- Jackson, Graham S., Jesse Burk-Rafel, Julie Ann Edgeworth, Anita Sicilia, Sabah Abdilahi, Justine Korteweg, Jonathan Mackey, et al. 2014. « Population Screening for Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Using a Novel Blood Test: Diagnostic Accuracy and Feasibility Study ». *JAMA Neurology* 71 (4):421-28.
- Jackson, Walker S., Andrew W. Borkowski, Henryk Faas, Andrew D. Steele, Oliver D. King, Nicki Watson, Alan Jasanoff, et Susan Lindquist. 2009. « Spontaneous Generation of Prion Infectivity in Fatal Familial Insomnia Knockin Mice ». *Neuron* 63 (4):438-50.
- James, T. L., H. Liu, N. B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D. G. Donne, K. Kaneko, et al. 1997. « Solution Structure of a 142-Residue Recombinant Prion Protein Corresponding to the Infectious Fragment of the Scrapie Isoform ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19):10086-91.
- Jansen, Casper, Piero Parchi, Sabina Capellari, Ad J. Vermeij, Patrizia Corrado, Frank Baas, Rosaria Strammiello, Willem A. van Gool, John C. van Swieten, et Annemieke J. M. Rozemuller. 2010. « Prion Protein Amyloidosis with Divergent Phenotype Associated with Two Novel Nonsense Mutations in PRNP ». *Acta Neuropathologica* 119 (2):189-97.
- Jarrett, J. T., et P. T. Lansbury. 1993. « Seeding "one-Dimensional Crystallization" of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie? » *Cell* 73 (6):1055-58.
- Jeffrey, M., C. M. Goodsir, M. E. Bruce, P. A. McBride, J. R. Scott, et W. G. Halliday. 1992. « Infection Specific Prion Protein (PrP) Accumulates on Neuronal Plasmalemma in Scrapie Infected Mice ». *Neuroscience Letters* 147 (1):106-9.
- Jo, Junghyun, Yixin Xiao, Alfred Xuyang Sun, Engin Cukuroglu, Hoang-Dai Tran, Jonathan Göke, Zi Ying Tan, et al. 2016. « Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons ». *Cell Stem Cell* 19 (2):248-57.
- Joiner S., Linehan J.M, Brandner S., Wadsworth J.D.F., et Collinge J. 2005. « High levels of disease related prion protein in the ileum in variant Creutzfeldt-Jakob disease ». *Gut* 54(10): 1506-1508.
- Jucker, Mathias, et Lary C. Walker. 2013. « Self-Propagation of Pathogenic Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature* 501 (7465):45-51.
- Kaatz, Martin, Christine Fast, Ute Ziegler, Anne Balkema-Buschmann, Bärbel Hammerschmidt, Markus Keller, Anja Oelschlegel, Leila McIntyre, et Martin H. Groschup. 2012. « Spread of

- Classic BSE Prions from the Gut via the Peripheral Nervous System to the Brain ». *The American Journal of Pathology* 181 (2):515-24.
- Kaski, Diego, Simon Mead, Harpreet Hyare, Sarah Cooper, Ravi Jampana, James Overell, Richard Knight, John Collinge, et Peter Rudge. 2009. « Variant CJD in an Individual Heterozygous for PRNP Codon 129 ». *Lancet (London, England)* 374 (9707):2128.
- Keeling, D., C. Tait, et M. Makris. 2008. « Guideline on the Selection and Use of Therapeutic Products to Treat Haemophilia and Other Hereditary Bleeding Disorders. A United Kingdom Haemophilia Center Doctors' Organisation (UKHCDO) Guideline Approved by the British Committee for Standards in Haematology ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (4):671-84.
- Kenny, Joanna, Ione Woollacott, Carolin Koriath, Laszlo Hosszu, Gary Adamson, Peter Rudge, Martin N. Rossor, John Collinge, Jonathan D. Rohrer, et Simon Mead. 2017. « A Novel Prion Protein Variant in a Patient with Semantic Dementia ». *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Khosravani, Houman, Yunfeng Zhang, Shigeki Tsutsui, Shahid Hameed, Christophe Altier, Jawed Hamid, Lina Chen, et al. 2008. « Prion Protein Attenuates Excitotoxicity by Inhibiting NMDA Receptors ». *The Journal of General Physiology* 131 (6): 5.
- Kim B.H., Lee H.G., Choi J.K., Kim J.I., Choi E.K., Carp R.I., Kim Y.S. 2004. « The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation ». *Brain Res Mol Brain Res* 124(1): 40-50.
- Kim, Dohoon, Chun-Hyung Kim, Jung-Il Moon, Young-Gie Chung, Mi-Yoon Chang, Baek-Soo Han, Sanghyeok Ko, et al. 2009. « Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins ». *Cell stem cell* 4 (6):472-76.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, et al. 2010. « Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 467 (7313):285-90.
- Kim J., Kim J. I., Cali I., Surewicz K., Kong Q., Raymond G. J., Atarashi R., Race B., Qing L., Gambetti P., Caughey B., Surewicz W. K. 2010. « Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors ». *J. Biol. Chem.*
- Kim, Soochan, Sinsuk Han, Ye Eun Lee, Woong-Jae Jung, Hyung Soo Lee, Yong-Sun Kim, Eun-Kyoung Choi, et Mi-Yeon Kim. 2016. « Prion Protein-Deficient Mice Exhibit Decreased CD4 T and LTI Cell Numbers and Impaired Spleen Structure ». *Immunobiology* 221 (1):94-102.
- Kim, Tae-Yung, Hyun-Joo Shon, Yi-Seok Joo, Un-Kyong Mun, Kyung-Sun Kang, et Yong-Soon Lee. 2005. « Additional Cases of Chronic Wasting Disease in Imported Deer in Korea ». *The Journal of Veterinary Medical Science* 67 (8):753-59.
- Kimberlin, R. H. 1982. « Scrapie Agent: Prions or Virinos? » *Nature* 297 (5862):107-8.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1980. « Pathogenesis of Mouse Scrapie: Evidence for Neural Spread of Infection to the CNS ». *The Journal of General Virology* 51 (1):183-87.
- Kimberlin, R. H., et C. A. 1982. « Pathogenesis of Mouse Scrapie: Patterns of Agent Replication in Different Parts of the CNS Following Intraperitoneal Infection ». *Journal of the Royal Society of Medicine* 75 (8):618-24.
- Kimberlin, R. H., et C. A. 1986. « Pathogenesis of Scrapie (Strain 263K) in Hamsters Infected Intracerebrally, Intraperitoneally or Intraocularly ». *The Journal of General Virology* 67 (Pt 2) (février):255-63.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1988. « Pathogenesis of Experimental Scrapie ». *Ciba Foundation Symposium* 135:37-62.
- Kimberlin, R. H., et C. A. Walker. 1989. « The Role of the Spleen in the Neuroinvasion of Scrapie in Mice ». *Virus Research* 12 (3):201-11.
- Kirkwood, J. K., et A. A. Cunningham. 1994. « Epidemiological Observations on Spongiform Encephalopathies in Captive Wild Animals in the British Isles ». *The Veterinary Record* 135 (13):296-303.

- Kitamoto, T., T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-Ura, et J. Tateishi. 1991. « Abnormal Isoform of Prion Protein Accumulates in Follicular Dendritic Cells in Mice with Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Journal of Virology* 65 (11):6292-95.
- Kittelberger, Reinhold, Melanie J. Chaplin, Marion M. Simmons, Ana Ramirez-Villaescusa, Lachlan McIntyre, Stuart C. MacDiarmid, Michaela J. Hannah, et al. 2010. « Atypical Scrapie/Nor98 in a Sheep from New Zealand ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22 (6):863-75.
- Klatzo, I., D. C. Gajdusek, et V. Zigas. 1959. « Pathology of Kuru ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 8 (4):799-847.
- Klein, M. A., R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinkernagel, et A. Aguzzi. 1997. « A Crucial Role for B Cells in Neuroinvasive Scrapie ». *Nature* 390 (6661):687-90.
- Klein, M. A., R. Frigg, A. J. Raeber, E. Flechsig, I. Hegyi, R. M. Zinkernagel, C. Weissmann, et A. Aguzzi. 1998. « PrP Expression in B Lymphocytes Is Not Required for Prion Neuroinvasion ». *Nature Medicine* 4 (12):1429-33.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, et G. R. Martin. 1982. « Role of Endogenous Collagen Synthesis in the Adhesion of Human Skin Fibroblasts ». *Cell Biology International Reports* 6 (6):591-99.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, et B. Caughey. 1994. « Cell-Free Formation of Protease-Resistant Prion Protein ». *Nature* 370 (6489):471-74.
- Korth, C., B. Stierli, P. Streit, M. Moser, O. Schaller, R. Fischer, W. Schulz-Schaeffer, et al. 1997. « Prion (PrP^{Sc})-Specific Epitope Defined by a Monoclonal Antibody ». *Nature* 390 (6655):74-77.
- Korth, Carsten, Barnaby C. H. May, Fred E. Cohen, et Stanley B. Prusiner. 2001. « Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17).
- Kovacs, Gabor G., Alexander Peden, Serge Weis, Romana Höftberger, Anna S. Berghoff, Helen Yull, Thomas Ströbel, et al. 2013. « Rapidly Progressive Dementia with Thalamic Degeneration and Peculiar Cortical Prion Protein Immunoreactivity, but Absence of Proteinase K Resistant PrP: A New Disease Entity? ». *Acta Neuropathologica Communications* 1 (11): 72.
- Kovács, Gábor G., Gianriccardo Trabattoni, Johannes A. Hainfellner, James W. Ironside, Richard S. G. Knight, et Herbert Budka. 2002. « Mutations of the Prion Protein Gene Phenotypic Spectrum ». *Journal of Neurology* 249 (11):1567-82.
- Krautler, Nike Julia, Veronika Kana, Jan Kranich, Yinghua Tian, Dushan Perera, Doreen Lemm, Petra Schwarz, et al. 2012. « Follicular Dendritic Cells Emerge from Ubiquitous Perivascular Precursors ». *Cell* 150 (1):194-206.
- Krejcirova, Zuzana, James Alibhai, Chen Zhao, Robert Krencik, Nina M. Rzechorzek, Erik M. Ullian, Jean Manson, James W. Ironside, Mark W. Head, et Siddharthan Chandran. 2017. « Human Stem Cell-Derived Astrocytes Replicate Human Prions in a PRNP Genotype-Dependent Manner ». *The Journal of Experimental Medicine*.
- Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring, et S. J. DeArmond. 1986. « Scrapie Prion Proteins Are Synthesized in Neurons ». *The American Journal of Pathology* 122 (1):1-5.
- Lacroux, Caroline, Emmanuel Comoy, Mohammed Moudjou, Armand Perret-Liaudet, Séverine Lugan, Claire Litaize, Hugh Simmons, et al. 2014. « Preclinical Detection of Variant CJD and BSE Prions in Blood ». *PLoS Pathogens* 10 (6).
- Lacroux, Caroline, Stéphanie Simon, Sylvie L. Benestad, Séverine Maillet, Jacinthe Mathey, Séverine Lugan, Fabien Corbière, et al. 2008. « Prions in Milk from Ewes Incubating Natural Scrapie ». *PLoS Pathogens* 4 (12).
- Ladogana, A., Q. Liu, Y. G. Xi, et M. Pocchiari. 1995. « Proteinase-Resistant Protein in Human Neuroblastoma Cells Infected with Brain Material from Creutzfeldt-Jakob Patient ». *Lancet (London, England)* 345 (8949):594-95.

- Ladogana, A., M. Puopolo, E. A. Croes, H. Budka, C. Jarius, S. Collins, G. M. Klug, et al. 2005. « Mortality from Creutzfeldt-Jakob Disease and Related Disorders in Europe, Australia, and Canada ». *Neurology* 64 (9): 1586-91.
- Laferrière, Florent, Philippe Tixador, Mohammed Moudjou, Jérôme Chapuis, Pierre Sibille, Laetitia Herzog, Fabienne Reine, et al. 2013. « Quaternary Structure of Pathological Prion Protein as a Determining Factor of Strain-Specific Prion Replication Dynamics ». *PLoS Pathogens* 9 (10).
- Lampert, P. W., D. C. Gajdusek, et C. J. Gibbs. 1972. « Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. » *The American Journal of Pathology* 68 (3):626-52.
- Lancaster, Madeline A., et Juergen A. Knoblich. 2014. « Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells ». *Nature Protocols* 9 (10):2329-40.
- Lancaster, Madeline A., Magdalena Renner, Carol-Anne Martin, Daniel Wenzel, Louise S. Bicknell, Matthew E. Hurler, Tessa Homfray, Josef M. Penninger, Andrew P. Jackson, et Juergen A. Knoblich. 2013. « Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly ». *Nature* 501 (7467):373-79.
- Lansbury, P. T., et B. Caughey. 1995. « The Chemistry of Scrapie Infection: Implications of the "Ice 9" Metaphor ». *Chemistry & Biology* 2 (1):1-5.
- Lasmézas, C. I., J. P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J. M. Peyrin, J. G. Fournier, J. J. Hauw, J. Rossier, et D. Dormont. 1997. « Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 275 (5298):402-5.
- Lasmézas, Corinne Ida, Jean-Philippe Deslys, Rémi Demaimay, Karim T. Adjou, Jean-Jacques Hauw, et Dominique Dormont. 1996. « Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy ». *Journal of General Virology* 77 (7):1601-9.
- Latarjet, R., B. Muel, D. A. Haig, M. C. Clarke, et T. Alper. 1970. « Inactivation of the Scrapie Agent by near Monochromatic Ultraviolet Light ». *Nature* 227 (5265):1341-43.
- Laurén, Juha, David A. Gimbel, Haakon B. Nygaard, John W. Gilbert, et Stephen M. Strittmatter. 2009. « Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid-Beta Oligomers ». *Nature* 457 (7233): 1128-32.
- Lazarini, F., J. P. Deslys, et D. Dormont. 1991. « Regulation of the Glial Fibrillary Acidic Protein, Beta Actin and Prion Protein mRNAs during Brain Development in Mouse ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 10 (4):343-46.
- Le Dur, Annick, Vincent Béringue, Olivier Andréoletti, Fabienne Reine, Thanh Lan Lai, Thierry Baron, Bjørn Bratberg, et al. 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):16031-36.
- Lefrère, Jean-Jacques. 2007. « [The risk of prion contamination through the transfusion of cellular products] ». *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine* 14 (1):25-34.
- Lefrère, Jean-Jacques, et Patricia Hewitt. 2009. « From Mad Cows to Sensible Blood Transfusion: The Risk of Prion Transmission by Labile Blood Components in the United Kingdom and in France ». *Transfusion* 49 (4):797-812.
- Legname, Giuseppe, Ilia V. Baskakov, Hoang-Oanh B. Nguyen, Detlev Riesner, Fred E. Cohen, Stephen J. DeArmond, et Stanley B. Prusiner. 2004. « Synthetic Mammalian Prions ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5684):673-76.
- Lescoutra-Etcheagaray, Nathalie, Nina Jaffré, Chryslain Sumian, Valérie Durand, Evelyne Correia, Jacqueline Mikol, Sophie Luccantoni-Freire, Audrey Culeux, Jean-Philippe Deslys, et Emmanuel E. Comoy. 2015a. « Evaluation of the Protection of Primates Transfused with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease-Infected Blood Products Filtered with Prion Removal Devices: A 5-Year Update ». *Transfusion* 55 (6):1231-41.
- Lescoutra-Etcheagaray, Nathalie, Chryslain Sumian, Audrey Culeux, Valérie Durand, Patrick V. Gurgel, Jean-Philippe Deslys, et Emmanuel E. Comoy. 2014. « Removal of Exogenous Prion Infectivity

- in Leukoreduced Red Blood Cells Unit by a Specific Filter Designed for Human Transfusion ». *Transfusion* 54 (4):1037-45.
- Levavasseur E., Anne-Gaëlle Biacabe A.G., Comoy E., Culeux A., Grznarova K., Privat N., Simoneau S., Flan B., Sazdovitch V., Seilhean D., Baron T., et Haïk S. 2017. « Detection and partial discrimination of atypical and classical bovine spongiform encephalopathies in cattle and primates using real-time quacking-induced conversion assay ». *Plos One*. 12(2).
- Lewis, Victoria, Cathryn L. Haigh, Colin L. Masters, Andrew F. Hill, Victoria A. Lawson, et Steven J. Collins. 2012. « Prion Subcellular Fractionation Reveals Infectivity Spectrum, with a High Titre-Low PrPres Level Disparity ». *Molecular Neurodegeneration* 7 (4): 18.
- Li, Aimin, et David A. Harris. 2005. « Mammalian Prion Protein Suppresses Bax-Induced Cell Death in Yeast ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (17):17430-34.
- Li, Linheng, et Ting Xie. 2005. « Stem Cell Niche: Structure and Function ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21:605-31.
- Li, R., D. Liu, G. Zanusso, T. Liu, J. D. Fayen, J. H. Huang, R. B. Petersen, P. Gambetti, et M. S. Sy. 2001. « The Expression and Potential Function of Cellular Prion Protein in Human Lymphocytes ». *Cellular Immunology* 207 (1):49-58.
- Liang, Jingjing, et Qingzhong Kong. 2012. « α -Cleavage of Cellular Prion Protein ». *Prion* 6 (5):453-60.
- Liao, Jing, Zhao Wu, Ying Wang, Lu Cheng, Chun Cui, Yuan Gao, Taotao Chen, et al. 2008. « Enhanced Efficiency of Generating Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells from Human Somatic Cells by a Combination of Six Transcription Factors ». *Cell Research* 18 (5):600-603.
- Liberski, Pawel P. 2012. « Historical Overview of Prion Diseases: A View from Afar ». *Folia Neuropathologica* 50 (1):1-12.
- Liberski, Pawel P., Beata Sikorska, et Paul Brown. 2012. « Kuru: The First Prion Disease ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 724:143-53.
- Linden, Rafael. 2017. « The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10:77.
- Linden, Rafael, Vilma R. Martins, Marco A. M. Prado, Martín Cammarota, Iván Izquierdo, et Ricardo R. Brentani. 2008. « Physiology of the Prion Protein ». *Physiological Reviews* 88 (2):673-728.
- Liu, Jun, Deepashree Balehosur, Belinda Murray, Jennifer M. Kelly, Huseyin Sumer, et Paul J. Verma. 2012. « Generation and Characterization of Reprogrammed Sheep Induced Pluripotent Stem Cells ». *Theriogenology* 77 (2):338-346.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. G. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, et R. G. Will. 2004. « Possible Transmission of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease by Blood Transfusion ». *Lancet (London, England)* 363 (9407):417-21.
- Lo Sardo, Valentina, William Ferguson, Galina A. Erikson, Eric J. Topol, Kristin K. Baldwin, et Ali Torkamani. 2017. « Influence of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 35 (1):69-74.
- Loh, Yuin-Han, Suneet Agarwal, In-Hyun Park, Achia Urbach, Hongguang Huo, Garrett C. Heffner, Kitai Kim, Justine D. Miller, Kitwa Ng, et George Q. Daley. 2009. « Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Blood ». *Blood* 113 (22):5476-79.
- Lombardi, Guerino, Cristina Casalone, Antonio D'Angelo, Daniela Gelmetti, Gloria Torcoli, Ilaria Barbieri, Cristiano Corona, et al. 2008. « Intraspecies Transmission of BASE Induces Clinical Dullness and Amyotrophic Changes ». *PLoS Pathogens* 4 (5).
- Lopes, Marilene H., Glauca N. M. Hajj, Angelita G. Muras, Gabriel L. Mancini, Rosa M. P. S. Castro, Karina C. B. Ribeiro, Ricardo R. Brentani, Rafael Linden, et Vilma R. Martins. 2005. « Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 Promotes Neuritogenesis and Neuroprotection by Distinct Signaling Pathways ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49):11330-39.
- Loubet, Damien, Caroline Dakowski, Mathéa Pietri, Elodie Pradines, Sophie Bernard, Jacques Callebert, Hector Ardila-Osorio, et al. 2012. « Neuritogenesis: The Prion Protein Controls β 1

- Integrin Signaling Activity ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (2):678-90.
- Lühken, Gesine, Anne Buschmann, Horst Brandt, Martin Eiden, Martin H. Groschup, et Georg Erhardt. 2007. « Epidemiological and Genetical Differences between Classical and Atypical Scrapie Cases ». *Veterinary Research* 38 (1):65-80.
- Mabbott, N. A., K. L. Brown, J. Manson, et M. E. Bruce. 1997. « T-Lymphocyte Activation and the Cellular Form of the Prion Protein ». *Immunology* 92 (2):161-65.
- Mabbott, N. A., A. Williams, C. F. Farquhar, M. Pasparakis, G. Kollias, et M. E. Bruce. 2000. « Tumor Necrosis Factor Alpha-Deficient, but Not Interleukin-6-Deficient, Mice Resist Peripheral Infection with Scrapie ». *Journal of Virology* 74 (7):3338-44.
- Mabbott, Neil A., et G. Gordon MacPherson. 2006. « Prions and Their Lethal Journey to the Brain ». *Nature Reviews. Microbiology* 4 (3):201-11.
- Makarava, Natallia, Gabor G. Kovacs, Regina Savtchenko, Irina Alexeeva, Herbert Budka, Robert G. Rohwer, et Ilia V. Baskakov. 2011. « Genesis of Mammalian Prions: From Non-Infectious Amyloid Fibrils to a Transmissible Prion Disease ». *PLoS Pathogens* 7 (12).
- Makrinou, Eleni, John Collinge, et Michael Antoniou. 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.
- Málaga-Trillo, Edward, Gonzalo P. Solis, Yvonne Schrock, Corinna Geiss, Lydia Luncz, Venus Thomanetz, et Claudia A. O. Stuermer. 2009. « Regulation of Embryonic Cell Adhesion by the Prion Protein ». *PLoS Biology* 7 (3).
- Mallucci, Giovanna, Andrew Dickinson, Jacqueline Linehan, Peter-Christian Klöhn, Sebastian Brandner, et John Collinge. 2003. « Depleting Neuronal PrP in Prion Infection Prevents Disease and Reverses Spongiosis ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646):871-74.
- Manganas, Louis N., Xueying Zhang, Yao Li, Raphael D. Hazel, S. David Smith, Mark E. Wagshul, Fritz Henn, et al. 2007. « Magnetic Resonance Spectroscopy Identifies Neural Progenitor Cells in the Live Human Brain ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5852):980-85.
- Mangé, Alain, Florence Béranger, Katell Peoc'h, Takashi Onodera, Yveline Frobert, et Sylvain Lehmann. 2004. « Alpha- and Beta- Cleavages of the Amino-Terminus of the Cellular Prion Protein ». *Biology of the Cell* 96 (2):125-32.
- Mangé, Alain, et Sylvain Lehmann. 2002. « Nouveaux aspects de la biologie de la protéine prion ». *M/S : médecine sciences* 18 (12): 1267-75.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell, et J. Hope. 1994a. « 129/Ola Mice Carrying a Null Mutation in PrP That Abolishes mRNA Production Are Developmentally Normal ». *Molecular Neurobiology* 8 (2-3):121-27.
- Manson, J. C., E. Jamieson, H. Baybutt, N. L. Tuzi, R. Barron, I. McConnell, R. Somerville, et al. 1999. « A Single Amino Acid Alteration (101L) Introduced into Murine PrP Dramatically Alters Incubation Time of Transmissible Spongiform Encephalopathy ». *The EMBO Journal* 18 (23):6855-64.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman, et J. Hope. 1992. « The Prion Protein Gene: A Role in Mouse Embryogenesis? ». *Development (Cambridge, England)* 115 (1):117-22.
- Manuelidis, Laura. 2007. « A 25 Nm Virion Is the Likely Cause of Transmissible Spongiform Encephalopathies ». *Journal of Cellular Biochemistry* 100 (4):897-915.
- Manuelidis, Laura, Ying Liu, et Brian Mullins. 2009. « Strain-Specific Viral Properties of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) Are Encoded by the Agent and Not by Host Prion Protein ». *Journal of Cellular Biochemistry* 106 (2):220-31.
- Manuelidis, Laura, Zhao-Xue Yu, Nuria Barquero, Nuria Banquero, et Brian Mullins. 2007. « Cells Infected with Scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease Agents Produce Intracellular 25-Nm Virus-like Particles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (6):1965-70.

- Marco, Mar Fernandez de, Jacqueline Linehan, O. Noel Gill, Jonathan P. Clewley, et Sebastian Brandner. 2010. « Large-Scale Immunohistochemical Examination for Lymphoreticular Prion Protein in Tonsil Specimens Collected in Britain ». *The Journal of Pathology* 222 (4):380-87.
- Mariani, Jessica, Gianfilippo Coppola, Ping Zhang, Alexej Abyzov, Lauren Provini, Livia Tomasini, Mariangela Amenduni, et al. 2015. « FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders ». *Cell* 162 (2):375-90.
- Marsh, Richard F., Anthony E. Kincaid, Richard A. Bessen, et Jason C. Bartz. 2005. « Interspecies Transmission of Chronic Wasting Disease Prions to Squirrel Monkeys (*Saimiri Sciureus*) ». *Journal of Virology* 79 (21):13794-96.
- Masters, C. L., D. C. Gajdusek, et C. J. Gibbs. 1981. « Creutzfeldt-Jakob Disease Virus Isolations from the Gerstmann-Sträussler Syndrome with an Analysis of the Various Forms of Amyloid Plaque Deposition in the Virus-Induced Spongiform Encephalopathies ». *Brain: A Journal of Neurology* 104 (3):559-88.
- Mastrianni, James A. 2010. « The Genetics of Prion Diseases ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12 (4):187-95.
- Matamoros-Angles, Andreu, Lucía Mayela Gayosso, Yvonne Richaud-Patin, Angelique di Domenico, Cristina Vergara, Arnau Hervera, Amaya Sousa, et al. 2017. « iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Sträussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate Tau Pathology ». *Molecular Neurobiology*, 1-16.
- Mathiason, Candace K., Jeanette Hayes-Klug, Sheila A. Hays, Jenny Powers, David A. Osborn, Sallie J. Dahmes, Karl V. Miller, et al. 2010. « B Cells and Platelets Harbor Prion Infectivity in the Blood of Deer Infected with Chronic Wasting Disease ». *Journal of Virology* 84 (10):5097-5107.
- Mayor, Susan. 2005. « Only a few more deaths from vCJD likely in UK ». *BMJ : British Medical Journal* 330 (7484):164.
- McCutcheon, Sandra, A. Richard Alejo Blanco, Boon Chin Tan, Lorenzo González, Stuart Martin, Gary Mallinson, Nigel E. Appleford, Marc L. Turner, Jean C. Manson, et E. Fiona Houston. 2015. « A Prion Reduction Filter Does Not Completely Remove Endogenous Prion Infectivity from Sheep Blood ». *Transfusion* 55 (9):2123-33.
- McDowell, Kristy L., Nabanita Nag, Zulmarie Franco, Ming Bu, Pedro Piccardo, Juraj Cervenak, Jean-Philippe Deslys, Emmanuel Comoy, David M. Asher, et Luisa Gregori. 2015. « Blood Reference Materials from Macaques Infected with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Agent ». *Transfusion* 55 (2):405-12.
- McGuire, Lynne I., Alexander H. Peden, Christina D. Orrú, Jason M. Wilham, Nigel E. Appleford, Gary Mallinson, Mary Andrews, et al. 2012. « Real Time Quaking-Induced Conversion Analysis of Cerebrospinal Fluid in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Annals of Neurology* 72 (2):278-85.
- McGuire, Lynne I., Anna Poleggi, Ilaria Poggiolini, Silvia Suardi, Katarina Grznarova, Song Shi, Bart de Vil, et al. 2016. « Cerebrospinal Fluid Real-Time Quaking-Induced Conversion Is a Robust and Reliable Test for Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease: An International Study ». *Annals of Neurology* 80 (1):160-65.
- McLennan, Neil F., Paul M. Brennan, Alisdair McNeill, Ioan Davies, Andrew Fotheringham, Kathleen A. Rennison, Diane Ritchie, et al. 2004. « Prion Protein Accumulation and Neuroprotection in Hypoxic Brain Damage ». *The American Journal of Pathology* 165 (1):227-35.
- McLeod, Neil P., Philip Nugent, Douglas Dixon, Mike Dennis, Mark Cornwall, Gary Mallinson, Nicholas Watkins, Stephen Thomas, et J. Mark Sutton. 2015. « Evaluation of Efficacy of Prion Reduction Filters Using Blood from an Endogenously Infected 263K Scrapie Hamster Model ». *Transfusion* 55 (10):2390-97.
- Mead, Simon, Sonia Gandhi, Jon Beck, Diana Caine, Dillip Gallujipali, Christopher Carswell, Harpreet Hyare, et al. 2013. « A Novel Prion Disease Associated with Diarrhea and Autonomic Neuropathy ». *The New England Journal of Medicine* 369 (20):1904-14.

- Mead, Simon, Michael P. H. Stumpf, Jerome Whitfield, Jonathan A. Beck, Mark Poulter, Tracy Campbell, James B. Uphill, et al. 2003. « Balancing Selection at the Prion Protein Gene Consistent with Prehistoric Kurulike Epidemics ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5619):640-43.
- Mead, Simon, Jerome Whitfield, Mark Poulter, Paresh Shah, James Uphill, Tracy Campbell, Huda Al-Dujaily, et al. 2009. « A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure ». *New England Journal of Medicine* 361 (21):2056-65.
- Mehrabian, Mohadeseh, Dylan Brethour, Hansen Wang, Zhengrui Xi, Ekaterina Rogaeva, et Gerold Schmitt-Ulms. 2015. « The Prion Protein Controls Polysialylation of Neural Cell Adhesion Molecule 1 during Cellular Morphogenesis ». *PLoS One* 10 (8).
- Merkle, Florian T., Asif Maroof, Takafumi Wataya, Yoshiki Sasai, Lorenz Studer, Kevin Eggan, et Alexander F. Schier. 2015. « Generation of Neuropeptidergic Hypothalamic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 142 (4):633-43.
- Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski, et K. Iqbal. 1981. « Abnormal Fibrils from Scrapie-Infected Brain ». *Acta Neuropathologica* 54 (1):63-74.
- Mestre-Francés, Nadine, Simon Nicot, Sylvie Rouland, Anne-Gaëlle Biacabe, Isabelle Quadrio, Armand Perret-Liaudet, Thierry Baron, et Jean-Michel Verdier. 2012. « Oral Transmission of L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy in Primate Model ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (1):142-45.
- Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry, et S. B. Prusiner. 1986. « Separation and Properties of Cellular and Scrapie Prion Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (8):2310-14.
- Meyer-Luehmann, Melanie, Janaky Coomaraswamy, Tristan Bolmont, Stephan Kaeser, Claudia Schaefer, Ellen Kilger, Anton Neuenschwander, et al. 2006. « Exogenous Induction of Cerebral Beta-Amyloidogenesis Is Governed by Agent and Host ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5794):1781-84.
- Miele, G., A. R. Alejo Blanco, H. Baybutt, S. Horvat, J. Manson, et M. Clinton. 2003. « Embryonic Activation and Developmental Expression of the Murine Prion Protein Gene ». *Gene Expression* 11 (1):1-12.
- Milhavel, Ollivier, Danielle Casanova, Nathalie Chevallier, Ronald D. G. McKay, et Sylvain Lehmann. 2006a. « Neural Stem Cell Model for Prion Propagation ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (10):2284-91.
- Milhavel, Ollivier, et Sylvain Lehmann. 2002. « Oxidative Stress and the Prion Protein in Transmissible Spongiform Encephalopathies ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 38 (3):328-39.
- Miller, Justine D., Yosif M. Ganat, Sarah Kishinevsky, Robert L. Bowman, Becky Liu, Edmund Y. Tu, Pankaj Mandal, et al. 2013. « Human iPSC-based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-induced Aging ». *Cell stem cell* 13 (6):691-705.
- Miller, M. W., M. A. Wild, et E. S. Williams. 1998. « Epidemiology of Chronic Wasting Disease in Captive Rocky Mountain Elk ». *Journal of Wildlife Diseases* 34 (3):532-38.
- Miranda, A., P. Ramos-Ibeas, E. Pericuesta, M. A. Ramirez, et A. Gutierrez-Adan. 2013. « The Role of Prion Protein in Stem Cell Regulation ». *Reproduction (Cambridge, England)* 146 (3).
- Miranda, Alberto, Eva Pericuesta, Miguel Ángel Ramírez, et Alfonso Gutierrez-Adan. 2011. « Prion Protein Expression Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation ». *PLoS One* 6 (4).
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, et Shinya Yamanaka. 2003. « The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells ». *Cell* 113 (5):631-42.
- Mohan, Joanne, John Hopkins, et Neil A Mabbott. 2005. « Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure ». *Immunology* 116 (1):122-33.
- Mohri, S., S. Handa, et J. Tateishi. 1987. « Lack of Effect of Thymus and Spleen on the Incubation Period of Creutzfeldt-Jakob Disease in Mice. » *The Journal of General Virology* 68 (4): 1187-89.

- Mok, Tzehow, Zane Jaunmuktane, Susan Joiner, Tracy Campbell, Catherine Morgan, Benjamin Wakerley, Farhad Golestani, et al. 2017. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129 ». *The New England Journal of Medicine* 376 (3):292-94.
- Molesworth, Anna M., Jan Mackenzie, Dawn Everington, Richard S. G. Knight, et Robert G. Will. 2011. « Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease and Risk of Blood Transfusion in the United Kingdom ». *Transfusion* 51 (8):1872-1873.
- Montagna, Pasquale, Pierluigi Gambetti, Pietro Cortelli, et Elio Lugaresi. 2003. « Familial and Sporadic Fatal Insomnia ». *The Lancet. Neurology* 2 (3):167-76.
- Montrasio, F., A. Cozzio, E. Flechsig, D. Rossi, M. A. Klein, T. Rüllicke, A. J. Raeber, et al. 2001. « B Lymphocyte-Restricted Expression of Prion Protein Does Not Enable Prion Replication in Prion Protein Knockout Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7):4034-37.
- Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. Mackay, A. Aguzzi, et C. Weissmann. 2000. « Impaired Prion Replication in Spleens of Mice Lacking Functional Follicular Dendritic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5469):1257-59.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, et al. 1999. « Ataxia in Prion Protein (PrP)-Deficient Mice Is Associated with Upregulation of the Novel PrP-like Protein Doppel ». *Journal of Molecular Biology* 292 (4):797-817.
- Moore, R. C., N. J. Redhead, J. Selfridge, J. Hope, J. C. Manson, et D. W. Melton. 1995. « Double Replacement Gene Targeting for the Production of a Series of Mouse Strains with Different Prion Protein Gene Alterations ». *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 13 (9):999-1004.
- Moudjou M., Chapuis J., Mekrouti M., Reine F., Herzog L., Laude H., Rezaei H., Dron M., et Béringue V. 2016. « Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification ». *Scientific Reports*.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, et O. Kellermann. 2000. « Signal Transduction through Prion Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 289 (5486):1925-28.
- Mouillet-Richard, S., I. Laurendeau, M. Vidaud, O. Kellermann, et J. L. Laplanche. 1999. « Prion Protein and Neuronal Differentiation: Quantitative Analysis of Prnp Gene Expression in a Murine Inducible Neuroectodermal Progenitor ». *Microbes and Infection* 1 (12):969-76.
- Mouillet-Richard, et Vilotte. 2015. *Promiscuous Functions of the Prion Protein Gene Family*. Vol. 3. Frontiers in Cell and Developmental Biology.
- Muratore, Christina R., Heather C. Rice, Priya Srikant, Dana G. Callahan, Taehwan Shin, Lawrence N. P. Benjamin, Dominic M. Walsh, Dennis J. Selkoe, et Tracy L. Young-Pearse. 2014. « The Familial Alzheimer's Disease APPV717I Mutation Alters APP Processing and Tau Expression in iPSC-Derived Neurons ». *Human Molecular Genetics* 23 (13):3523-36.
- Murray, K., D. L. Ritchie, M. Bruce, C. A. Young, M. Doran, J. W. Ironside, et R. G. Will. 2008. « Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in Two Adolescents ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (1):14-18.
- Naslavsky, N., R. Stein, A. Yanai, G. Friedlander, et A. Taraboulos. 1997. « Characterization of Detergent-Insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (10):6324-31.
- Nguyen, Ha Nam, Blake Byers, Branden Cord, Aleksandr Shcheglovitov, James Byrne, Prachi Gujar, Kehkooi Kee, et al. 2011. « LRRK2 Mutant iPSC-Derived DA Neurons Demonstrate Increased Susceptibility to Oxidative Stress ». *Cell Stem Cell* 8 (3):267-80.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler, et A. Smith. 1998. « Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4 ». *Cell* 95 (3):379-91.

- Nieznanski, Krzysztof, Jin-Kyu Choi, Shugui Chen, Krystyna Surewicz, et Witold K. Surewicz. 2012. « Soluble Prion Protein Inhibits Amyloid- β (A β) Fibrillization and Toxicity ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (40):33104-8.
- Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhavel, et S. Lehmann. 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):320-25.
- Nishida, N., P. Tremblay, T. Sugimoto, K. Shigematsu, S. Shirabe, C. Petromilli, S. P. Erpel, et al. 1999. « A Mouse Prion Protein Transgene Rescues Mice Deficient for the Prion Protein Gene from Purkinje Cell Degeneration and Demyelination ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 79 (6):689-97.
- Nishino, Yudai, Yoichi Yamada, Katsumi Ebisawa, Sayaka Nakamura, Kazuto Okabe, Eri Umemura, Kenji Hara, et Minoru Ueda. 2011. « Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) Enhance Wound Healing and the Possibility of Novel Cell Therapy ». *Cytotherapy* 13 (5): 598-605.
- Nonno, Romolo, Michele A. Di Bari, Franco Cardone, Gabriele Vaccari, Paola Fazzi, Giacomo Dell'Omo, Claudia Cartoni, et al. 2006. « Efficient Transmission and Characterization of Creutzfeldt-Jakob Disease Strains in Bank Voles ». *PLoS Pathogens* 2 (2).
- Nuvolone, Mario, Mario Hermann, Silvia Sorce, Giancarlo Russo, Cinzia Tiberi, Petra Schwarz, Eric Minikel, Despina Sanoudou, Pawel Pelczar, et Adriano Aguzzi. 2016. « Strictly Co-Isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} Mice: A Rigorous Resource for Prion Science ». *The Journal of Experimental Medicine* 213 (3):313-27.
- Nyström, Sofie, et Per Hammarström. 2014. « Is the Prevalent Human Prion Protein 129M/V Mutation a Living Fossil from a Paleolithic Panzootic Superprion Pandemic? ». *Prion* 8 (1):2-10.
- Oesch, B., D. Westaway, et S. B. Prusiner. 1991. « Prion Protein Genes: Evolutionary and Functional Aspects ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 172:109-24.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, et L. E. Hood. 1985. « A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein ». *Cell* 40 (4):735-46.
- Okada, H., Y. Iwamaru, M. Imamura, K. Masujin, Y. Matsuura, Y. Murayama, S. Mohri, et T. Yokoyama. 2011. « Detection of Disease-Associated Prion Protein in the Posterior Portion of the Small Intestine Involving the Continuous Peyer's Patch in Cattle Orally Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy Agent ». *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (4):333-43.
- Okita, Keisuke, Tomoko Ichisaka, et Shinya Yamanaka. 2007. « Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature* 448 (7151):313-17.
- Okita, Keisuke, Masato Nakagawa, Hong Hyenjong, Tomoko Ichisaka, et Shinya Yamanaka. 2008. « Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells without Viral Vectors ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903):949-53.
- O'Rourke, K. I., T. P. Huff, C. W. Leathers, M. M. Robinson, et J. R. Gorham. 1994. « SCID Mouse Spleen Does Not Support Scrapie Agent Replication ». *The Journal of General Virology* 75 (6): 1511-14.
- Orrú Christina D., Wilham J.M., Raymond L.D., Kuhn F., Schroeder B., Raeber A.J. et Caughey B. 2011. « Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion ». *MBio Journal*. 10; 2(3).

- Orrú, Christina D., Matilde Bongianni, Giovanni Tonoli, Sergio Ferrari, Andrew G. Hughson, Bradley R. Groveman, Michele Fiorini, et al. 2014. « A Test for Creutzfeldt-Jakob Disease Using Nasal Brushings ». *The New England Journal of Medicine* 371 (6):519-29.
- Orrú, Christina D., Jue Yuan, Brian S. Appleby, Baiya Li, Yu Li, Dane Winner, Zerui Wang, et al. 2017. « Prion Seeding Activity and Infectivity in Skin Samples from Patients with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Science Translational Medicine* 9 (417).
- Ozel, M., Y. G. Xi, E. Baldauf, H. Diringer, et M. Pocchiari. 1994. « Small Virus-like Structure in Brains from Cases of Sporadic and Familial Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Lancet (London, England)* 344 (8927):923-24.
- Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes, et J. Collinge. 1991. « Homozygous Prion Protein Genotype Predisposes to Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Nature* 352 (6333): 340-42.
- Paltrinieri, Saverio, Stefano Comazzi, Valentina Spagnolo, Marco Rondena, Wilma Ponti, et Fabrizio Cecilian. 2004. « Bovine Doppel (Dpl) and Prion Protein (PrP) Expression on Lymphoid Tissue and Circulating Leukocytes ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 52 (12):1639-45.
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, et F. E. Cohen. 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):10962-66.
- Panigaj, Martin, Adela Brouckova, Hana Glierova, Eva Dvorakova, Jan Simak, Jaroslav G. Vostal, et Karel Holada. 2011. « Underestimation of the Expression of Cellular Prion Protein on Human Red Blood Cells ». *Transfusion* 51 (5):1012-21.
- Panigaj, Martin, Adela Brouckova, Hana Glierova, et Karel Holada. 2005. « Expression of Cellular Prion Protein (PrPc) on Human Red Blood Cells. » *Blood* 106 (11):1898-1898.
- Papassotiropoulos, Andreas, M. Axel Wollmer, Adriano Aguzzi, Christoph Hock, Roger M. Nitsch, et Dominique J.-F. de Quervain. 2005. « The Prion Gene Is Associated with Human Long-Term Memory ». *Human Molecular Genetics* 14 (15):2241-46.
- Parchi, Piero, Rosaria Strammiello, Armin Giese, et Hans Kretzschmar. 2011. « Phenotypic Variability of Sporadic Human Prion Disease and Its Molecular Basis: Past, Present, and Future ». *Acta Neuropathologica* 121 (1):91-112.
- Park, In-Hyun, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, et George Q. Daley. 2008. « Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells ». *Cell* 134 (5):877-86.
- Paşca, Anca M., Steven A. Sloan, Laura E. Clarke, Yuan Tian, Christopher D. Makinson, Nina Huber, Chul Hoon Kim, et al. 2015. « Functional Cortical Neurons and Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells in 3D Culture ». *Nature Methods* 12 (7):671-78.
- Pass, Rachel, Karen Frudd, James P. Barnett, Claudia A. Blindauer, et David R. Brown. 2015. « Prion Infection in Cells Is Abolished by a Mutated Manganese Transporter but Shows No Relation to Zinc ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 68: 186-93.
- Passet, Bruno, Rachel Young, Samira Makhzami, Marthe Vilotte, Florence Jaffrezic, Sophie Halliez, Stéphan Bouet, et al. 2012. « Prion Protein and Shadoo Are Involved in Overlapping Embryonic Pathways and Trophoblastic Development ». *PLoS One* 7 (7).
- Pattison, I. H. 1965. « Scrapie in the Welsh Mountain Breed of Sheep and Its Experimental Transmission to Goats ». *The Veterinary Record* 77 (47):1388-90.
- Pattison, I. H., et K. M. Jones. 1967. « The Possible Nature of the Transmissible Agent of Scrapie ». *The Veterinary Record* 80 (1):2-9.
- Pattison, et Smith. 1963. « Histological observations on experimental scrapie in the mouse ». *Research in veterinary science*, 269.
- Peden, A., L. McCardle, M. W. Head, S. Love, H. J. T. Ward, S. N. Cousens, D. M. Keeling, C. M. Millar, F. G. H. Hill, et J. W. Ironside. 2010. « Variant CJD Infection in the Spleen of a Neurologically Asymptomatic UK Adult Patient with Haemophilia ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 16 (2):296-304.

- Peden, Alexander H., Mark W. Head, Diane L. Ritchie, Jeanne E. Bell, et James W. Ironside. 2004. « Preclinical vCJD after Blood Transfusion in a PRNP Codon 129 Heterozygous Patient ». *Lancet (London, England)* 364 (9433):527-29.
- Petit, Constance S. V., Laura Besnier, Etienne Morel, Monique Rousset, et Sophie Thenet. 2013. « Roles of the Cellular Prion Protein in the Regulation of Cell-Cell Junctions and Barrier Function ». *Tissue Barriers* 1 (2).
- Piao, Yue-Shan, Akiyoshi Kakita, Hiroyuki Watanabe, Tetsuyuki Kitamoto, et Hitoshi Takahashi. 2005. « Sporadic Fatal Insomnia with Spongiform Degeneration in the Thalamus and Widespread PrPSc Deposits in the Brain ». *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 25 (2):144-49.
- Pietri, Mathéa, Caroline Dakowski, Samia Hannaoui, Aurélie Alleaume-Butaux, Julia Hernandez-Rapp, Audrey Ragagnin, Sophie Mouillet-Richard, et al. 2013. « PDK1 Decreases TACE-Mediated α -Secretase Activity and Promotes Disease Progression in Prion and Alzheimer's Diseases ». *Nature Medicine* 19 (9):1124-31.
- Plummer, P. J. G. 1946. « Scrapie—A Disease of Sheep ». *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 10 (2):49-54.
- Politopoulou, G., J. D. Seebach, M. Schmutz, H. P. Schwarz, et A. Aguzzi. 2000. « Age-Related Expression of the Cellular Prion Protein in Human Peripheral Blood Leukocytes ». *Haematologica* 85 (6):580-87.
- Polo, Jose M., Susanna Liu, Maria Eugenia Figueroa, Warakorn Kulalert, Sarah Eminli, Kah Yong Tan, Effie Apostolou, et al. 2010. « Cell Type of Origin Influences the Molecular and Functional Properties of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 28 (8):848-55.
- Prcina M., Filipcik P. et Kontsekova E. 2010. « Establishment of the cell line expressing human prion protein on PrP⁰/0 background ». *Acta Virol.* 54(4): 297-302.
- Premzl, Marko, Lorenzo Sangiorgio, Bice Strumbo, Jennifer A. Marshall Graves, Tatjana Simonic, et Jill E. Gready. 2003. « Shadoo, a New Protein Highly Conserved from Fish to Mammals and with Similarity to Prion Protein ». *Gene* 314: 89-102.
- Prinz, Marco, Mathias Heikenwalder, Tobias Junt, Petra Schwarz, Markus Glatzel, Frank L. Heppner, Yang-Xin Fu, Martin Lipp, et Adriano Aguzzi. 2003. « Positioning of Follicular Dendritic Cells within the Spleen Controls Prion Neuroinvasion ». *Nature* 425 (6961):957-62.
- Prinz, Marco, Fabio Montrasio, Michael A. Klein, Petra Schwarz, Josef Priller, Bernhard Odermatt, Klaus Pfeffer, et Adriano Aguzzi. 2002. « Lymph Nodal Prion Replication and Neuroinvasion in Mice Devoid of Follicular Dendritic Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2):919-24.
- Properzi, Francesca, Mariantonia Logozzi, Hanin Abdel-Haq, Cristina Federici, Luana Lugini, Tommaso Azzarito, Ilaria Cristofaro, et al. 2015. « Detection of Exosomal Prions in Blood by Immunochemistry Techniques ». *The Journal of General Virology* 96 (Pt 7):1969-74.
- Prowse, C. V., et A. Bailey. 2000. « Validation of Prion Removal by Leucocyte-Depleting Filters: A Cautionary Tale ». *Vox Sanguinis* 79 (4):248.
- Prowse, C. V., V. S. Hornsey, O. Drummond, I. R. MacGregor, D. S. Pepper, G. R. Barclay, H. Bethel, et al. 1999. « Preliminary Assessment of Whole-Blood, Red-Cell and Platelet- Leucodepleting Filters for Possible Induction of Prion Release by Leucocyte Fragmentation during Room Temperature Processing ». *British Journal of Haematology* 106 (1):240-47.
- Prusiner, S. B. 1982. « Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie ». *Science (New York, N.Y.)* 216 (4542):136-44.
- Prusiner, S. B. 1991. « Molecular Biology of Prion Diseases ». *Science (New York, N.Y.)* 252 (5012):1515-22.
- Prusiner, S. B. 1998. « Prions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23):13363-83.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, D. C. Bolton, S. B. Kent, et L. E. Hood. 1984. « Purification and Structural Studies of a Major Scrapie Prion Protein ». *Cell* 38 (1):127-34.

- Prusiner, S. B., D. F. Groth, M. P. McKinley, S. P. Cochran, K. A. Bowman, et K. C. Kasper. 1981. « Thiocyanate and Hydroxyl Ions Inactivate the Scrapie Agent ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7):4606-10.
- Puckett, C., P. Concannon, C. Casey, et L. Hood. 1991. « Genomic Structure of the Human Prion Protein Gene ». *American Journal of Human Genetics* 49 (2):320-29.
- Puig, Berta, Hermann C. Altmeppen, Dana Thurm, Markus Geissen, Catharina Conrad, Thomas Braulke, et Markus Glatzel. 2011. « N-Glycans and Glycosylphosphatidylinositol-Anchors Act on Polarized Sorting of Mouse PrP(C) in Madin-Darby Canine Kidney Cells ». *PLoS One* 6 (9).
- Puopolo, Maria, Anna Ladogana, Vito Vetrugno, et Maurizio Pocchiari. 2011. « Transmission of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease by Blood Transfusion: Risk Factor or Possible Biases ». *Transfusion* 51 (7):1556-66.
- Qian, Xuyu, Ha Nam Nguyen, Fadi Jacob, Hongjun Song, et Guo-Li Ming. 2017. « Using Brain Organoids to Understand Zika Virus-Induced Microcephaly ». *Development (Cambridge, England)* 144 (6):952-57.
- Qin, K., M. O'Donnell, et R. Y. Zhao. 2006. « Doppel: More Rival than Double to Prion ». *Neuroscience* 141 (1):1-8.
- Race, Brent, Kimberly D. Meade-White, Michael W. Miller, Kent D. Barbian, Richard Rubenstein, Giuseppe LaFauci, Larisa Cervenakova, et al. 2009. « Susceptibilities of Nonhuman Primates to Chronic Wasting Disease ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (9):1366-76.
- Race, Brent, Kimberly D. Meade-White, Katie Phillips, James Striebel, Richard Race, et Bruce Chesebro. 2014. « Chronic Wasting Disease Agents in Nonhuman Primates ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (5):833-37.
- Raeber, A. J., F. Montrasio, I. Hegyi, R. Frigg, M. A. Klein, A. Aguzzi, et C. Weissmann. 2001. « Studies on Prion Replication in Spleen ». *Developmental Immunology* 8 (3-4):291-304.
- Raeber, A. J., A. Sailer, I. Hegyi, M. A. Klein, T. Rülcke, M. Fischer, S. Brandner, A. Aguzzi, et C. Weissmann. 1999. « Ectopic Expression of Prion Protein (PrP) in T Lymphocytes or Hepatocytes of PrP Knockout Mice Is Insufficient to Sustain Prion Replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7):3987-92.
- Raja, Waseem K., Alison E. Mungenast, Yuan-Ta Lin, Tak Ko, Fatema Abdurrob, Jinsoo Seo, et Li-Huei Tsai. 2016. « Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes ». *PLOS ONE* 11 (9).
- Re, Lamberto, Francesca Rossini, Francesco Re, Marica Bordicchia, Alessandra Mercanti, Olga Sonia Leon Fernandez, et Simone Barocci. 2006. « Prion Protein Potentiates Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction ». *Pharmacological Research* 53 (1):62-68.
- Reed, L. J., et H. Muench. 1938. « A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS ». *American Journal of Epidemiology* 27 (3):493-97.
- Reesink, H. W., C. P. Engelfriet, L. Muylle, S. Wendel, E. Dickmeiss, T. Krusius, T. Mäki, et al. 2003. « Future Counselling of Donors and Recipients of Blood Products Concerning Prion-Related Diseases ». *Vox Sanguinis* 85 (2):126-48.
- Reif, A., S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, M. Lauer, A. Schmitt, et K.-P. Lesch. 2006. « Neural Stem Cell Proliferation Is Decreased in Schizophrenia, but Not in Depression ». *Molecular Psychiatry* 11 (5):514-22.
- Relaño-Ginés, Aroa, Sylvain Lehmann, et Carole Crozet. 2014. « Prion Diseases and Adult Neurogenesis: How Do Prions Counteract the Brain's Endogenous Repair Machinery? ». *Prion* 8 (3):240-46.
- Reynolds, B. A., et S. Weiss. 1992. « Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System ». *Science (New York, N.Y.)* 255 (5052):1707-10.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, et K. Wüthrich. 1996. « NMR Structure of the Mouse Prion Protein Domain PrP(121-231) ». *Nature* 382 (6587):180-82.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, et K. Wüthrich. 1997. « NMR Characterization of the Full-Length Recombinant Murine Prion Protein, mPrP(23-231) ». *FEBS Letters* 413 (2):282-88.

- Riesner, Detlev. 2003. « Biochemistry and Structure of PrP(C) and PrP(Sc) ». *British Medical Bulletin* 66:21-33.
- Robakis, N. K., P. R. Sawh, G. C. Wolfe, R. Rubenstein, R. I. Carp, et M. A. Innis. 1986. « Isolation of a cDNA Clone Encoding the Leader Peptide of Prion Protein and Expression of the Homologous Gene in Various Tissues ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (17):6377-81.
- Robertson, Catherine, Stephanie A. Booth, Daniel R. Beniac, Michael B. Coulthart, Timothy F. Booth, et Archibald McNicol. 2006. « Cellular Prion Protein Is Released on Exosomes from Activated Platelets ». *Blood* 107 (10):3907-11.
- Rodolfa, Kit T., et Kevin Eggan. 2006. « A Transcriptional Logic for Nuclear Reprogramming ». *Cell* 126 (4):652-55.
- Rossi, D., A. Cozzio, E. Flechsig, M. A. Klein, T. Rülcke, A. Aguzzi, et C. Weissmann. 2001. « Onset of Ataxia and Purkinje Cell Loss in PrP Null Mice Inversely Correlated with Dpl Level in Brain ». *The EMBO Journal* 20 (4):694-702.
- Roucou, Xavier, Malcolm Gains, et Andréa C. LeBlanc. 2004. « Neuroprotective Functions of Prion Protein ». *Journal of Neuroscience Research* 75 (2):153-61.
- Rubenstein, R., H. Deng, R. E. Race, W. Ju, C. L. Scalici, M. C. Papini, R. J. Kascsak, et R. I. Carp. 1992. « Demonstration of Scrapie Strain Diversity in Infected PC12 Cells ». *The Journal of General Virology* 73 (11): 3027-31.
- Russell, W.M.S. et Burch, R.L. 1959. « The Principles of Humane Experimental Technique » *Methuen*.
- Rybner-Barnier C., Jacquemot C., Cuhe C., Doré G., Majlessi L., Gabellec M.M., Moris A., Schwartz O., Di Santo J., Cumano A., Leclerc C., et Lazarini F. 2006. « Processing of the Bovine Spongiform Encephalopathy-Specific Prion Protein by Dendritic cells ». *The Journal of Virology* 80(10): 4656-4663.
- Ryder, S., G. Dexter, S. Bellworthy, et S. Tongue. 2004. « Demonstration of Lateral Transmission of Scrapie between Sheep Kept under Natural Conditions Using Lymphoid Tissue Biopsy. » *Research in Veterinary Science* 76 (3):211-17.
- Saá, Paula, Joaquín Castilla, et Claudio Soto. 2006. « Presymptomatic Detection of Prions in Blood ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5783):92-94.
- Saá, Paula, Oksana Yakovleva, Jorge de Castro, Irina Vasilyeva, Silvia H. De Paoli, Jan Simak, et Larisa Cervenakova. 2014. « First Demonstration of Transmissible Spongiform Encephalopathy-Associated Prion Protein (PrPTSE) in Extracellular Vesicles from Plasma of Mice Infected with Mouse-Adapted Variant Creutzfeldt-Jakob Disease by in Vitro Amplification ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (42):29247-60.
- Saborio, G. P., B. Permanne, et C. Soto. 2001. « Sensitive Detection of Pathological Prion Protein by Cyclic Amplification of Protein Misfolding ». *Nature* 411 (6839):810-13.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, et al. 1996. « Loss of Cerebellar Purkinje Cells in Aged Mice Homozygous for a Disrupted PrP Gene ». *Nature* 380 (6574):528-31.
- Sakudo, Akikazu, Izuru Nakamura, Kazuyoshi Ikuta, et Takashi Onodera. 2007. « Recent Developments in Prion Disease Research: Diagnostic Tools and in Vitro Cell Culture Models ». *The Journal of Veterinary Medical Science* 69 (4):329-37.
- Sala, Carole, Eric Morignat, Nadia Oussaïd, Emilie Gay, David Abrial, Christian Ducrot, et Didier Calavas. 2012. « Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France ». *BMC Veterinary Research* 8: 74.
- Salès, Nicole, Raymonde Hässig, Katia Rodolfo, Luigi Di Giamberardino, Elisabeth Traiffort, Martial Ruat, Philippe Frétier, et Kenneth L. Moya. 2002. « Developmental Expression of the Cellular Prion Protein in Elongating Axons ». *The European Journal of Neuroscience* 15 (7):1163-77.
- Sandberg, Malin K., Huda Al-Doujaily, Bernadette Sharps, Anthony R. Clarke, et John Collinge. 2011. « Prion Propagation and Toxicity in Vivo Occur in Two Distinct Mechanistic Phases ». *Nature* 470 (7335):540-42.

- Saunders, C., P. Herbert, G. Rowe, M. Hayward, K. Wilkins, J. Milligan, M. Stenning, A. Seacombe, et C. Prowse. 2005. « In-Vitro Evaluation of the PALL Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter as a Secondary Device Following Primary Leucoreduction ». *Vox Sanguinis* 89 (4):220-28.
- Satoh, J., Yukitake M., Kurohara K., Nishida N., Katamine S., Miyamoto T., et Kuroda Y. 1998. « Cultured skin fibroblasts isolated from mice devoid of the prion protein gene express major heat shock proteins in response to heat stress ». *Exp Neurol*. 151(1): 105-15.
- Scaravilli, Francesco, Rebecca J. Cordery, Hans Kretzschmar, Pierluigi Gambetti, Brian Brink, Vivian Fritz, James Temlett, et al. 2000. « Sporadic Fatal Insomnia: A Case Study ». *Annals of Neurology* 48 (4):665-69.
- Schätzl, H. M., M. Da Costa, L. Taylor, F. E. Cohen, et S. B. Prusiner. 1995. « Prion Protein Gene Variation among Primates ». *Journal of Molecular Biology* 245 (4):362-74.
- Schmitt-Ulms, G., G. Legname, M. A. Baldwin, H. L. Ball, N. Bradon, P. J. Bosque, K. L. Crossin, et al. 2001. « Binding of Neural Cell Adhesion Molecules (N-CAMs) to the Cellular Prion Protein ». *Journal of Molecular Biology* 314 (5):1209-25.
- Schneider, Benoît, Vincent Mutel, Mathéa Pietri, Myriam Ermonval, Sophie Mouillet-Richard, et Odile Kellermann. 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):13326-31.
- Schneider, Kurt, Heiner Fangerau, Britta Michaelsen, et Wolfgang H.-M. Raab. 2008. « The Early History of the Transmissible Spongiform Encephalopathies Exemplified by Scrapie ». *Brain Research Bulletin* 77 (6):343-55.
- Schreuder, B. E., L. J. van Keulen, M. E. Vromans, J. P. Langeveld, et M. A. Smits. 1996. « Preclinical Test for Prion Diseases ». *Nature* 381 (6583):563.
- Schröder, Heinz C., et Werner E. G. Müller. 2002. « Neuroprotective Effect of Flupirtine in Prion Disease ». *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)* 38 (1):49-58.
- Schröter, A., I. Zerr, K. Henkel, H. J. Tschampa, M. Finkenstaedt, et S. Poser. 2000. « Magnetic Resonance Imaging in the Clinical Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Archives of Neurology* 57 (12):1751-57.
- Seeger, Harald, Mathias Heikenwalder, Nicolas Zeller, Jan Kranich, Petra Schwarz, Ariana Gaspert, Burkhardt Seifert, Gino Miele, et Adriano Aguzzi. 2005. « Coincident Scrapie Infection and Nephritis Lead to Urinary Prion Excretion ». *Science (New York, N.Y.)* 310 (5746):324-26.
- Shibuya, S., J. Higuchi, R.-W. Shin, J. Tateishi, et T. Kitamoto. 1998. « Protective Prion Protein Polymorphisms against Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease ». *The Lancet* 351 (9100):419.
- Shimada, Tadayuki, Alyson E. Fournier, et Kanato Yamagata. 2013. « Neuroprotective Function of 14-3-3 Proteins in Neurodegeneration ». *BioMed Research International* 2013:564534.
- Shultz, Leonard D., Bonnie L. Lyons, Lisa M. Burzenski, Bruce Gott, Xiaohua Chen, Stanley Chaleff, Malak Kotb, et al. 2005. « Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-Scid IL2R Gamma Null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (10):6477-89.
- Sigurdson, Christina J., et Adriano Aguzzi. 2007. « Chronic Wasting Disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772 (6):610-18.
- Silveira, Jay R., Andrew G. Hughson, et Byron Caughey. 2006. « Fractionation of Prion Protein Aggregates by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation ». *Methods in Enzymology* 412:21-33.
- Silveira, Jay R., Gregory J. Raymond, Andrew G. Hughson, Richard E. Race, Valerie L. Sim, Stanley F. Hayes, et Byron Caughey. 2005. « The Most Infectious Prion Protein Particles ». *Nature* 437 (7056):257-61.
- Simák, Jan, Karel Holada, Felice D'Agnillo, Jan Janota, et Jaroslav G. Vostal. 2002. « Cellular Prion Protein Is Expressed on Endothelial Cells and Is Released during Apoptosis on Membrane Microparticles Found in Human Plasma ». *Transfusion* 42 (3):334-42.

- Simmons, Marion M., Timm Konold, Hugh A. Simmons, Yvonne I. Spencer, Richard Lockey, John Spiropoulos, Sharon Everitt, et Derek Clifford. 2007. « Experimental Transmission of Atypical Scrapie to Sheep ». *BMC Veterinary Research* 3 (8) :20.
- Simmons, Marion M., S. Jo Moore, Timm Konold, Lisa Thurston, Linda A. Terry, Leigh Thorne, Richard Lockey, et al. 2011. « Experimental Oral Transmission of Atypical Scrapie to Sheep ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (5):848-54.
- Simoneau, Steve, Achim Thomzig, Marie-Madeleine Ruchoux, Nicolas Vignier, Martin L. Daus, Anna Poggi, Pierre Lebon, et al. 2015. « Synthetic Scrapie Infectivity: Interaction between Recombinant PrP and Scrapie Brain-Derived RNA ». *Virulence* 6 (2):132-44.
- Simons, M., P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. G. Dotti, et K. Simons. 1998. « Cholesterol Depletion Inhibits the Generation of Beta-Amyloid in Hippocampal Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11):6460-64.
- Simpson, D. A., H. Lander, et H. N. Robson. 1959. « Observations on Kuru: II. Clinical Features ». *Australasian Annals of Medicine* 8 (1):8-15.
- Sklaviadis, T., R. Dreyer, et L. Manuelidis. 1992. « Analysis of Creutzfeldt-Jakob Disease Infectious Fractions by Gel Permeation Chromatography and Sedimentation Field Flow Fractionation ». *Virus Research* 26 (3):241-54.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, et D. Rogers. 1988. « Inhibition of Pluripotential Embryonic Stem Cell Differentiation by Purified Polypeptides ». *Nature* 336 (6200):688-90.
- Soldner, Frank, Dirk Hockemeyer, Caroline Beard, Qing Gao, George W. Bell, Elizabeth G. Cook, Gunnar Hargus, et al. 2009. « Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors ». *Cell* 136 (5):964-77.
- Soto, Claudio, Gabriela P. Saborio, et Laurence Anderes. 2002. « Cyclic Amplification of Protein Misfolding: Application to Prion-Related Disorders and beyond ». *Trends in Neurosciences* 25 (8):390-94.
- Sowemimo-Coker, Samuel, Regina Kascsak, Anzi Kim, Fabiola Andrade, Susan Pesci, Richard Kascsak, Clifford Meeker, Richard Carp, et Paul Brown. 2005. « Removal of Exogenous (Spiked) and Endogenous Prion Infectivity from Red Cells with a New Prototype of Leukoreduction Filter ». *Transfusion* 45 (12):1839-44.
- Spalding, Kirsty L., Olaf Bergmann, Kanar Alkass, Samuel Bernard, Mehran Salehpour, Hagen B. Huttner, Emil Boström, et al. 2013. « Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans ». *Cell* 153 (6):1219-27.
- Sparkes, R. S., M. Simon, V. H. Cohn, R. E. Fournier, J. Lem, I. Klisak, C. Heinzmann, C. Blatt, M. Lucero, et T. Mohandas. 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):7358-62.
- Stadtfeld, Matthias, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, et Konrad Hochedlinger. 2008. « Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903):945-49.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame, et S. B. Prusiner. 1993. « Structural Studies of the Scrapie Prion Protein Using Mass Spectrometry and Amino Acid Sequencing ». *Biochemistry* 32 (8):1991-2002.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao, et S. B. Prusiner. 1987. « Scrapie Prion Protein Contains a Phosphatidylinositol Glycolipid ». *Cell* 51 (2):229-40.
- Steele, Andrew D., Jason G. Emsley, P. Hande Ozdinler, Susan Lindquist, et Jeffrey D. Macklis. 2006a. « Prion Protein (PrP^c) Positively Regulates Neural Precursor Proliferation during Developmental and Adult Mammalian Neurogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (9):3416-21.
- Steiniger, Birte S. 2015. « Human Spleen Microanatomy: Why Mice Do Not Suffice ». *Immunology* 145 (3):334-46.

- Steiniger, Birte S., Verena Wilhelmi, Anja Seiler, Katrin Lampp, et Vitus Stachniss. 2014. « Heterogeneity of Stromal Cells in the Human Splenic White Pulp. Fibroblastic Reticulum Cells, Follicular Dendritic Cells and a Third Superficial Stromal Cell Type ». *Immunology* 143 (3):462-77.
- Supattapone, Surachai. 2004. « Prion Protein Conversion in Vitro ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 82 (6):348-56.
- Swerdlow, A. J., C. D. Higgins, P. Adlard, M. E. Jones, et M. A. Preece. 2003. « Creutzfeldt-Jakob Disease in United Kingdom Patients Treated with Human Pituitary Growth Hormone ». *Neurology* 61 (6):783-91.
- Tagliavini, F., G. Forloni, L. Colombo, G. Rossi, L. Girola, B. Canciani, N. Angeretti, et al. 2000. « Tetracycline Affects Abnormal Properties of Synthetic PrP Peptides and PrP(Sc) in Vitro ». *Journal of Molecular Biology* 300 (5):1309-22.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5):861-72.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4):663-76.
- Talluri, Thirumala R., Dharmendra Kumar, Silke Glage, Wiebke Garrels, Zoltan Ivics, Katharina Debowski, Rüdiger Behr, Heiner Niemann, et Wilfried A. Kues. 2015. « Derivation and Characterization of Bovine Induced Pluripotent Stem Cells by Transposon-Mediated Reprogramming ». *Cellular Reprogramming* 17 (2):131-40.
- Tanaka, Motomasa, Peter Chien, Nariman Naber, Roger Cooke, et Jonathan S. Weissman. 2004. « Conformational Variations in an Infectious Protein Determine Prion Strain Differences ». *Nature* 428 (6980):323-28.
- Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo, S. B. Prusiner, et D. Avraham. 1995. « Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Targeting Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform ». *The Journal of Cell Biology* 129 (1):121-32.
- Tateishi, Jun, Paul Brown, Tetsuyuki Kitamoto, Zahirul M. Hoque, Raymond Roos, Robert Wollman, Larisa Cervenàková, et D. Carleton Gajdusek. 1995. « First Experimental Transmission of Fatal Familial Insomnia ». *Nature* 376 (6539).
- Taupin, Philippe. 2006a. « Adult Neural Stem Cells, Neurogenic Niches, and Cellular Therapy ». *Stem Cell Reviews* 2 (3):213-19.
- Taupin, Philippe. 2006b. « Adult Neurogenesis and Neuroplasticity ». *Restorative Neurology and Neuroscience* 24 (1):9-15.
- Taylor, D. M., H. Fraser, I. McConnell, D. A. Brown, K. L. Brown, K. A. Lamza, et G. R. Smith. 1994. « Decontamination Studies with the Agents of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie ». *Archives of Virology* 139 (3-4):313-26.
- Taylor, D. M., I. McConnell, et H. Fraser. 1996. « Scrapie Infection Can Be Established Readily through Skin Scarification in Immunocompetent but Not Immunodeficient Mice ». *The Journal of General Virology* 77 (7): 1595-99.
- Teljeur, Conor, Martin Flattery, Patricia Harrington, Michelle O'Neill, Patrick S. Moran, Linda Murphy, et Máirín Ryan. 2012. « Cost-Effectiveness of Prion Filtration of Red Blood Cells to Reduce the Risk of Transfusion-Transmitted Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in the Republic of Ireland ». *Transfusion* 52 (11):2285-93.
- Telling, G. C., M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond, et S. B. Prusiner. 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):9936-40.
- Thackray, Alana M., Kleinand, Michael A., et Bujdoso Raymond. 2003. « Subclinical prion disease induced by oral inoculation ». *Journal of Virology* 77 (14): 7991-7998.

- Themistocleous, Andreas C., Robin Kennett, Masud Husain, Jacqueline Palace, Simon Mead, et David L. H. Bennett. 2014. « Late onset hereditary sensory and autonomic neuropathy with cognitive impairment associated with Y163X prion mutation ». *Journal of Neurology* 261 (11):2230-33.
- Thompsett, Andrew R., Salama R. Abdelraheim, Maki Daniels, et David R. Brown. 2005. « High Affinity Binding between Copper and Full-Length Prion Protein Identified by Two Different Techniques ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (52):42750-58.
- Thompson, Andrew, Angus MacKay, Peter Rudge, Ana Lukic, Marie-Claire Porter, Jessica Lowe, John Collinge, et Simon Mead. 2014. « Behavioral and Psychiatric Symptoms in Prion Disease ». *The American Journal of Psychiatry* 171 (3):265-74.
- Thompson, Barry J., et Stephen M. Cohen. 2006. « The Hippo Pathway Regulates the Bantam microRNA to Control Cell Proliferation and Apoptosis in *Drosophila* ». *Cell* 126 (4):767-74.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et J. M. Jones. 1998. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391):1145-47.
- Tixador, Philippe, Laëtizia Herzog, Fabienne Reine, Emilie Jaumain, Jérôme Chapuis, Annick Le Dur, Hubert Laude, et Vincent Béringue. 2010. « The Physical Relationship between Infectivity and Prion Protein Aggregates Is Strain-Dependent ». *PLoS Pathogens* 6 (4).
- Tobin, Stacey C., et Kitai Kim. 2012. « Generating Pluripotent Stem Cells: Differential Epigenetic Changes during Cellular Reprogramming ». *FEBS Letters* 586 (18):2874-81.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rülicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, et J. C. Manson. 1996. « Altered Circadian Activity Rhythms and Sleep in Mice Devoid of Prion Protein ». *Nature* 380 (6575):639-42.
- Toni, Mattia, Maria L. Massimino, Agnese De Mario, Elisa Angiulli, et Enzo Spisni. 2017. « Metal Dyshomeostasis and Their Pathological Role in Prion and Prion-Like Diseases: The Basis for a Nutritional Approach ». *Frontiers in Neuroscience* 11: 3.
- Torres, Juan-María, Olivier Andréoletti, Caroline Lacroux, Irene Prieto, Patricia Lorenzo, Magdalena Larska, Thierry Baron, et Juan-Carlos Espinosa. 2011. « Classical Bovine Spongiform Encephalopathy by Transmission of H-Type Prion in Homologous Prion Protein Context ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (9):1636-44.
- Tranulis, M. A., A. Osland, B. Bratberg, et M. J. Ulvund. 1999. « Prion Protein Gene Polymorphisms in Sheep with Natural Scrapie and Healthy Controls in Norway ». *The Journal of General Virology* 80 (4): 1073-77.
- Tremblay, Patrick, Essia Bouzamondo-Bernstein, Cornelia Heinrich, Stanley B. Prusiner, et Stephen J. DeArmond. 2007. « Developmental Expression of PrP in the Post-Implantation Embryo ». *Brain Research* 1139 (3):60-67.
- Truchot, L., T. Arnaud, C. Bloy, et A. Perret-Liaudet. 2006. « CJD PrPsc Removal by Nanofiltration Process: Application to a Therapeutic Immunoglobulin Solution (Lymphoglobuline) ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 34 (3):227-31.
- Turk, E., D. B. Teplow, L. E. Hood, et S. B. Prusiner. 1988. « Purification and Properties of the Cellular and Scrapie Hamster Prion Proteins ». *European Journal of Biochemistry* 176 (1):21-30.
- Urayama, Akihiko, Rodrigo Morales, Michael L. Niehoff, William A. Banks, et Claudio Soto. 2011. « Initial Fate of Prions upon Peripheral Infection: Half-Life, Distribution, Clearance, and Tissue Uptake ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (8):2792-2803.
- Urwin, P. J. M., J. M. Mackenzie, C. A. Llewelyn, R. G. Will, et P. E. Hewitt. 2016. « Creutzfeldt-Jakob Disease and Blood Transfusion: Updated Results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study ». *Vox Sanguinis* 110 (4):310-16.

- Valleron, A. J., P. Y. Boelle, R. Will, et J. Y. Cesbron. 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):1726-28.
- Vamvakas, Eleftherios C. 2011. « Universal White Blood Cell Reduction in Europe: Has Transmission of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Been Prevented? » *Transfusion Medicine Reviews* 25 (2):133-44.
- Veith, Nathalie M., Helmut Plattner, Claudia A. O. Stuermer, Walter J. Schulz-Schaeffer, et Alexander Bürkle. 2009. « Immunolocalisation of PrPSc in Scrapie-Infected N2a Mouse Neuroblastoma Cells by Light and Electron Microscopy ». *European Journal of Cell Biology* 88 (1):45-63.
- Vella, L. J., R. A. Sharples, V. A. Lawson, C. L. Masters, R. Cappai, et A. F. Hill. 2007. « Packaging of Prions into Exosomes Is Associated with a Novel Pathway of PrP Processing ». *The Journal of Pathology* 211 (5):582-90.
- Verity, C. M., A. Nicoll, R. G. Will, G. Devereux, et L. Stellitano. 2000. « Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in UK Children: A National Surveillance Study ». *Lancet (London, England)* 356 (9237):1224-27.
- Vilette, D., O. Andreoletti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann, et H. Laude. 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):4055-59.
- Vilette, Didier. 2008. « Cell Models of Prion Infection ». *Veterinary Research* 39 (4):10.
- Vincent, B., E. Paitel, Y. Frobert, S. Lehmann, J. Grassi, et F. Checler. 2000. « Phorbol Ester-Regulated Cleavage of Normal Prion Protein in HEK293 Human Cells and Murine Neurons ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (45):35612-16.
- Vincent, B., E. Paitel, P. Saftig, Y. Frobert, D. Hartmann, B. De Strooper, J. Grassi, E. Lopez-Perez, et F. Checler. 2001. « The Disintegrins ADAM10 and TACE Contribute to the Constitutive and Phorbol Ester-Regulated Normal Cleavage of the Cellular Prion Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41):37743-46.
- Vitali, P., E. Maccagnano, E. Caverzasi, R. G. Henry, A. Haman, C. Torres-Chae, D. Y. Johnson, B. L. Miller, et M. D. Geschwind. 2011. « Diffusion-Weighted MRI Hyperintensity Patterns Differentiate CJD from Other Rapid Dementias ». *Neurology* 76 (20):1711-19.
- Völkel, D., K. Zimmermann, I. Zerr, M. Bodemer, T. Lindner, P. L. Turecek, S. Poser, et H. P. Schwarz. 2001. « Immunochemical Determination of Cellular Prion Protein in Plasma from Healthy Subjects and Patients with Sporadic CJD or Other Neurologic Diseases ». *Transfusion* 41 (4):441-48.
- Vorberg, Ina, Anne Raines, et Suzette A. Priola. 2004. « Acute Formation of Protease-Resistant Prion Protein Does Not Always Lead to Persistent Scrapie Infection in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (28):29218-25.
- Waddell, L., J. Greig, M. Mascarenhas, A. Otten, T. Corrin, et K. Hierlihy. 2017. « Current Evidence on the Transmissibility of Chronic Wasting Disease Prions to Humans-A Systematic Review ». *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Wadsworth, J. D. F., E. A. Asante, et J. Collinge. 2010. « Review: Contribution of Transgenic Models to Understanding Human Prion Disease ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36 (7):576-97.
- Wadsworth, J. D., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert, et J. Collinge. 2001. « Tissue Distribution of Protease Resistant Prion Protein in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Using a Highly Sensitive Immunoblotting Assay ». *Lancet (London, England)* 358 (9277):171-80.
- Wadsworth, Jonathan D. F., Emmanuel A. Asante, Melanie Desbruslais, Jacqueline M. Linehan, Susan Joiner, Ian Gowland, Julie Welch, et al. 2004. « Human Prion Protein with Valine 129 Prevents Expression of Variant CJD Phenotype ». *Science (New York, N.Y.)* 306 (5702):1793-96.
- Wadsworth, Jonathan D. F., Inmaculada Dalmau-Mena, Susan Joiner, Jacqueline M. Linehan, Catherine O'Malley, Caroline Powell, Sebastian Brandner, et al. 2011. « Effect of Fixation on

- Brain and Lymphoreticular vCJD Prions and Bioassay of Key Positive Specimens from a Retrospective vCJD Prevalence Study ». *The Journal of Pathology* 223 (4):511-18.
- Walker, Lary C., et Mathias Jucker. 2015. « Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept ». *Annual Review of Neuroscience* 38: 87-103.
- Walmsley, Adrian R., Nicole T. Watt, David R. Taylor, W. Sumudhu S. Perera, et Nigel M. Hooper. 2009. « Alpha-Cleavage of the Prion Protein Occurs in a Late Compartment of the Secretory Pathway and Is Independent of Lipid Rafts ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 40 (2):242-48.
- Walter, Eric D., Daniel J. Stevens, Micah P. Visconte, et Glenn L. Millhauser. 2007. « The Prion Protein Is a Combined Zinc and Copper Binding Protein: Zn²⁺ Alters the Distribution of Cu²⁺ Coordination Modes ». *Journal of the American Chemical Society* 129 (50):15440-41.
- Wang, Fei, Xinhe Wang, Chong-Gang Yuan, et Jiyan Ma. 2010. « Generating a Prion with Bacterially Expressed Recombinant Prion Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5969):1132-35.
- Warren, Luigi, Philip D. Manos, Tim Ahfeldt, Yuin-Han Loh, Hu Li, Frank Lau, Wataru Ebina, et al. 2010. « Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA ». *Cell Stem Cell* 7 (5):618-30.
- Watt, Nicole T., David R. Taylor, Andrew Gillott, Daniel A. Thomas, W. Sumudhu S. Perera, et Nigel M. Hooper. 2005a. « Reactive Oxygen Species-Mediated Beta-Cleavage of the Prion Protein in the Cellular Response to Oxidative Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (43):35914-21.
- Watts, Joel C., et Stanley B. Prusiner. 2014. « Mouse Models for Studying the Formation and Propagation of Prions ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29):19841-49.
- Watts, Joel C., et David Westaway. 2007. « The Prion Protein Family: Diversity, Rivalry, and Dysfunction ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1772 (6):654-72.
- Webb, T., S. Mead, J. Beck, J. Uphill, S. Pal, S. Hampson, J. D. F. Wadsworth, et al. 2009. « Seven-Year Discordance in Age at Onset in Monozygotic Twins with Inherited Prion Disease (P102L) ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35 (4):427-32.
- Weissmann, Charles, Masato Enari, Peter-Christian Klöhn, Daniela Rossi, et Eckhard Flechsig. 2002. « Molecular Biology of Prions ». *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 62 (3):153-66.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, et R. Bradley. 1987. « A Novel Progressive Spongiform Encephalopathy in Cattle ». *The Veterinary Record* 121 (18):419-20.
- Whitfield, Jerome T., Wandagi H. Pako, John Collinge, et Michael P. Alpers. 2008. « Mortuary Rites of the South Fore and Kuru ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363 (1510):3721-24.
- Wik, Lotta, Mikael Klingeborn, Hanna Willander, et Tommy Linne. 2012. « Separate Mechanisms Act Concurrently to Shed and Release the Prion Protein from the Cell ». *Prion* 6 (5):498-509.
- Wilesmith, J. W., L. J. Hoinville, J. B. Ryan, et A. R. Sayers. 1992. « Bovine Spongiform Encephalopathy: Aspects of the Clinical Picture and Analyses of Possible Changes 1986-1990 ». *The Veterinary Record* 130 (10):197-201.
- Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, et M. J. Atkinson. 1991. « Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiological Studies on the Origin ». *The Veterinary Record* 128 (9):199-203.
- Will, R. G., A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, E. Mitrova, R. de Silva, et al. 1998. « Descriptive Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob Disease in Six European Countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD ». *Annals of Neurology* 43 (6):763-67.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, et P. G. Smith. 1996. « A New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK ». *Lancet (London, England)* 347 (9006):921-25.
- Williams, A., P. J. Lucassen, D. Ritchie, et M. Bruce. 1997. « PrP Deposition, Microglial Activation, and Neuronal Apoptosis in Murine Scrapie ». *Experimental Neurology* 144 (2):433-38.
- Williams, E. S. 2005. « Chronic Wasting Disease ». *Veterinary Pathology* 42 (5):530-49.

- Wopfner, F., G. Weidenhöfer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T. F. Schwarz, T. Werner, et H. M. Schätzl. 1999. « Analysis of 27 Mammalian and 9 Avian PrPs Reveals High Conservation of Flexible Regions of the Prion Protein ». *Journal of Molecular Biology* 289 (5):1163-78.
- Wroe, Stephen J., Suvankar Pal, Durrenajat Siddique, Harpreet Hyare, Rebecca Macfarlane, Susan Joiner, Jacqueline M. Linehan, et al. 2006. « Clinical Presentation and Pre-Mortem Diagnosis of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Associated with Blood Transfusion: A Case Report ». *Lancet (London, England)* 368 (9552):2061-67.
- Wulf, Marie-Angela, Assunta Senatore, et Adriano Aguzzi. 2017. « The Biological Function of the Cellular Prion Protein: An Update ». *BMC Biology* 15 (1):34.
- « www.creutzfeldt-jakob.aphp.f ». s. d. www.creutzfeldt-jakob.aphp.fr. Consulté le 18 novembre 2017. <http://www.creutzfeldt-jakob.aphp.fr/>.
- Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. Wells, et J. W. Wilesmith. 1991. « Naturally Occurring Scrapie-like Spongiform Encephalopathy in Five Domestic Cats ». *The Veterinary Record* 129 (11):233-36.
- Xin, Wei, Man-sun Sy, et Chaoyang Li. 2013. « Cellular Prion Protein and Cancers ». In *Prions and Diseases*, 49-66. Springer, New York, NY.
- Yadavalli, Rajgopal, Rodney P. Guttmann, Tanya Seward, Adrian P. Centers, R. Anthony Williamson, et Glenn C. Telling. 2004. « Calpain-Dependent Endoproteolytic Cleavage of PrP^{Sc} Modulates Scrapie Prion Propagation ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (21):21948-56.
- Yamanaka, Shinya. 2009. « A Fresh Look at iPS Cells ». *Cell* 137 (1):13-17.
- Yang, Hong, Yin Huang, Luisa Gregori, David M. Asher, Travis Bui, Richard A. Forshee, et Steven A. Anderson. 2017. « Geographic Exposure Risk of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in US Blood Donors: A Risk-Ranking Model to Evaluate Alternative Donor-Deferral Policies ». *Transfusion* 57 (4):924-32.
- Yang, Juan, Song Li, Xi-Biao He, Cheng Cheng, et Weidong Le. 2016. « Induced Pluripotent Stem Cells in Alzheimer's Disease: Applications for Disease Modeling and Cell-Replacement Therapy ». *Molecular Neurodegeneration* 11 (1):39.
- Yokoyama, T., K. M. Kimura, Y. Ushiki, S. Yamada, A. Morooka, T. Nakashiba, T. Sassa, et S. Itohara. 2001. « In Vivo Conversion of Cellular Prion Protein to Pathogenic Isoforms, as Monitored by Conformation-Specific Antibodies ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (14):11265-71.
- Young, Rachel, Bruno Passet, Marthe Vilotte, Edmond P. Cribiu, Vincent Béringue, Fabienne Le Provost, Hubert Laude, et Jean-Luc Vilotte. 2009. « The Prion or the Related Shadoo Protein Is Required for Early Mouse Embryogenesis ». *FEBS Letters* 583 (19):3296-3300.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858):1917-20.
- Yuan, Jue, Xiangzhu Xiao, John McGeehan, Zhiqian Dong, Ignazio Cali, Hisashi Fujioka, Qingzhong Kong, Geoff Kneale, Pierluigi Gambetti, et Wen-Quan Zou. 2006. « Insoluble Aggregates and Protease-Resistant Conformers of Prion Protein in Uninfected Human Brains ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (46):34848-58.
- Yunoki, Mikihiro, Hiroyuki Tanaka, Takeru Urayama, Shinji Hattori, Masahiro Ohtani, Yuji Ohkubo, Yoshiyasu Kawabata, et al. 2008. « Prion Removal by Nanofiltration under Different Experimental Conditions ». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 36 (1):27-36.
- Zahn, R., A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. López García, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, et K. Wüthrich. 2000. « NMR Solution Structure of the Human Prion Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1):145-50.
- Zanata, Silvio M., Marilene H. Lopes, Adriana F. Mercadante, Glaucia N. M. Hajj, Luciana B. Chiarini, Regina Nomizo, Adriana R. O. Freitas, et al. 2002. « Stress-Inducible Protein 1 Is a Cell Surface Ligand for Cellular Prion That Triggers Neuroprotection ». *The EMBO Journal* 21 (13):3307-16.

- Zanusso, Gianluigi, Salvatore Monaco, Maurizio Pocchiari, et Byron Caughey. 2016. « Advanced Tests for Early and Accurate Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Nature Reviews. Neurology* 12 (6):325-33.
- Zeidler, M., R. J. Sellar, D. A. Collie, R. Knight, G. Stewart, M. A. Macleod, J. W. Ironside, et al. 2000. « The Pulvinar Sign on Magnetic Resonance Imaging in Variant Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Lancet (London, England)* 355 (9213):1412-18.
- Zerr, I., M. Bodemer, O. Gefeller, M. Otto, S. Poser, J. Wiltfang, O. Windl, H. A. Kretzschmar, et T. Weber. 1998. « Detection of 14-3-3 Protein in the Cerebrospinal Fluid Supports the Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Annals of Neurology* 43 (1):32-40.
- Zerr, I., K. Kallenberg, D. M. Summers, C. Romero, A. Taratuto, U. Heinemann, M. Breithaupt, et al. 2009. « Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease ». *Brain* 132 (10):2659-68.
- Zhang, Cheng Cheng, Andrew D. Steele, Susan Lindquist, et Harvey F. Lodish. 2006. « Prion Protein Is Expressed on Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells and Is Important for Their Self-Renewal ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7):2184-89.
- Zhao, Xiao-yang, Wei Li, Zhuo Lv, Lei Liu, Man Tong, Tang Hai, Jie Hao, et al. 2009. « iPS Cells Produce Viable Mice through Tetraploid Complementation ». *Nature* 461 (7260):86-90.
- Zhou, Shuling, Karolina Szczesna, Anna Ochalek, Julianna Kobolák, Eszter Varga, Csilla Nemes, Abinaya Chandrasekaran, et al. 2016. « Neurosphere Based Differentiation of Human iPSC Improves Astrocyte Differentiation ». *Stem Cells International* 2016.
- Zigas, V., et D. C. Gajdusek. 1959. « Kuru. Clinical, pathological and epidemiological study of a recently discovered acute progressive degenerative disease of the central nervous system reaching "epidemic" proportions among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. » *Papua and New Guinea Medical Journal* 3:1-24.
- Zobeley, E., E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari, et C. Weissmann. 1999. « Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. » *Molecular Medicine* 5 (4):240-43.
- Zou, Jizhong, Morgan L. Maeder, Prashant Mali, Shondra M. Pruett-Miller, Stacey Thibodeau-Beganny, Bin-Kuan Chou, Guibin Chen, et al. 2009. « Gene Targeting of a Disease-Related Gene in Human Induced Pluripotent Stem and Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 5 (1):97-110.
- Zou, Wen-Quan, Gianfranco Puoti, Xiangzhu Xiao, Jue Yuan, Liuting Qing, Ignazio Cali, Miyuki Shimoji, et al. 2010. « Variably Protease-Sensitive Prionopathy: A New Sporadic Disease of the Prion Protein ». *Annals of Neurology* 68 (2):162-72.
- Zou, Wen-Quan, Xiangzhu Xiao, Jue Yuan, Gianfranco Puoti, Hisashi Fujioka, Xinglong Wang, Sandy Richardson, et al. 2011. « Amyloid-beta42 Interacts Mainly with Insoluble Prion Protein in the Alzheimer Brain ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (17):15095-105.