



HAL
open science

Étude de l'interaction de la protéine prion avec Cbln1, une protéine de la famille C1q

Vissal David Kheav

► **To cite this version:**

Vissal David Kheav. Étude de l'interaction de la protéine prion avec Cbln1, une protéine de la famille C1q. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00924816

HAL Id: dumas-00924816

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00924816>

Submitted on 7 Jan 2014

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université Joseph Fourier
**UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE DE
GRENOBLE**

Domaine de la Merci - 38706 LA TRONCHE CEDEX

Année : 2011

N°

**Étude de l'interaction de la protéine prion avec
Cbln1, une protéine de la famille C1q**

**MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE
MÉDICALE**

conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990
tenant lieu de

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2011
pour obtenir le Diplôme d'État de

Docteur en Pharmacie

par

Vissal David KHEAV

né le 12 décembre 1984 à Pontoise

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président : Monsieur le Professeur Christophe Ribuot

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron

Madame le Docteur Chantal Dumestre-Pérard

Madame le Docteur Catherine Lemaire-Vieille

À Titou

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- <i>À partir du 1^{er} mai</i>
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - <i>À partir du 1^{er} mai</i>
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

ATER (n= 5)

DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN Emilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET :	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse et Ontogénèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse et Ontogénèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Christophe Ribuot, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron, je vous suis vraiment reconnaissant pour l'accueil et l'accompagnement que vous m'avez offerts ces trois dernières années. Vos encouragements, la confiance que vous m'avez témoignée, ainsi que vos avis et conseils donnés sans détour ont été le support précieux de ma formation d'interne et de mes premiers pas en recherche fondamentale. Merci d'avoir pris le temps de ces discussions en tête-à-tête lorsque le moment de choix difficiles était venu.

Merci à Chantal Dumestre-Pérard. Ton parcours, ton énergie et ton soutien ont été le moteur de mon inscription en M2R. Ce choix a donné une orientation universitaire à ma carrière professionnelle, qui n'en aurait probablement pas eu autrement. Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Catherine Lemaire-Vieille. Ta bonne humeur, que même une journée sugar-free ne saurait altérer, n'est pas étrangère au plaisir que j'ai eu de venir travailler «chez les prions». Merci de m'avoir accompagné et tant aidé dans la rédaction de ce manuscrit. Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens particulièrement à remercier Jean Gagnon pour ses enseignements, ses conseils et son soutien. Ta gentillesse et ta patience ont été d'une grande valeur pour moi. Camille, merci pour ton aide de tous les jours, pour ta rigueur contagieuse et ta bonne humeur qui ne l'est pas moins. Merci aussi à Corinne et à Yahia pour leur aide et leurs conseils avisés.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Grenoble avec qui j'ai un un énorme plaisir à travailler pendant la moitié de mon internat ! Merci notamment à Marie-Christine Jacob pour m'avoir transmis

le virus de la cytométrie, à Denise Ponard pour son soutien et ses conseils, à Emma, Eve-Marie, et Emilie.

Une pensée pour mes co-internes qui ont marqué mes quatre dernières années et spécialement pour Julie qui parle si bien des banana splits et pour mes collègues des «concertations pluridisciplinaires» au Callag. Une autre pour ceux qui ont rythmé mon cursus en pharmacie, et notamment Carole, Jessica, Thomas, et Robin. Je pense évidemment aussi à toutes celles et ceux avec qui Pharmacomédie a fait ses premières années !

Merci à mes parents, qui m'ont mis sur les rails de la pharmacie et ont été très souvent une source précieuse de motivation et de soutien.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	12
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
1. Les maladies à prion	14
1.1. Historique.....	14
1.2. Diagnostic des maladies humaines à prion	16
1.2.1. Suspicion clinique	16
1.2.2. Imagerie	17
1.2.3. Biologie	17
1.2.4. Diagnostic de certitude	19
1.3. Présentations cliniques des maladies humaines à prion	20
1.3.1. Formes sporadiques	20
1.3.2. Formes familiales.....	22
1.3.3. Formes acquises (infectieuses ou iatrogènes)	23
1.4. Perspectives thérapeutiques	25
1.4.1. Essais thérapeutiques.....	25
1.4.2. Avancées théoriques	26
1.5. Prise en charge du patient.....	27
1.6. Prévention du risque iatrogène.....	29
1.6.1. Risques connus.....	29
1.6.2. Infections nosocomiales.....	29
1.6.3. Hémovigilance	30
2. Le prion et ses partenaires d'interaction	31
2.1. Les protéines prion	31
2.1.1. Protéine prion cellulaire, PrPC	31
2.1.2. Protéine prion pathologique, PrPSc.....	35

2.2. C1q et prion	38
2.3. Cbln1	40
OBJECTIFS DU PROJET	43
MATÉRIELS ET MÉTHODES	46
1. Expression de la Cbln1 recombinante en cellules HEK 293	47
2. Purification et concentration de Cbln1 recombinante.....	48
3. Électrophorèse des protéines	48
4. Expression et Purification de PrP recombinante.....	50
5. Oligomérisation de PrP et chromatographie d'exclusion de taille	51
6. ELISA	51
7. Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	52
RÉSULTATS	55
1. Production et caractérisation de l'His-HA-Cbln1	56
2. L'His-HA-Cbln1 interagit avec la PrP immobilisée.....	58
3. Les oligomères II de PrP interagissent avec l'His-HA-Cbln1 immobilisée..	60
4. Cbln1 influence l'oligomérisation de PrP	62
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	66
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72
SERMENT DE GALIEN.....	79

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Critères consensus du consortium MRI-CJD pour le diagnostic de CJD sporadique

Figure 2 : Représentation schématique de la structure primaire de la PrP^C et de ses modifications post-traductionnelles

Figure 3 : Structure tertiaire de la PrP^C déterminée par RMN, ancrée dans une bicouche lipidique

Figure 4 : Modèle d'agrégation de PrP

Figure 5 : Représentation schématique de la procédure de PMCA

Figure 6 : Dendrogramme phylogénique de la famille C1q

Figure 7 : Structures comparées de Cbln1 et C1q

Figure 8 : Structure primaire de Cbln1

Figure 9 : Schématisation de la construction His-HA-Cbln1

Figure 10 : Résonance Plasmonique de Surface

Figure 11 : Électrophorèse des protéines

Figure 12 : Spectre UV de l'His-HA-Cbln1 purifiée

Figure 13 : Etude de la fixation de Cbln1 sur PrP immobilisée par SPR et ELISA.

Figure 14 : Analyse comparée par chromatographie d'exclusion des monomères de PrP et des produits d'agrégation de PrP

Figure 15 : Etude de la fixation des oligomères II de PrP sur l'His-HA-Cbln1 immobilisée par ELISA

Figure 16 : Analyse par chromatographie d'exclusion des produits d'agrégation de PrP avec ou sans NaCl et His-HA-Cbln1

Figure 17 : Profil chromatographique du produit d'agrégation de PrP en présence de Cbln1

Tables

Table 1 : Génotypes du codon 129 de PRNP dans la population atteinte de CJD sporadique et dans la population témoin

Table 2 : Comparaison de propriétés de PrP^C et PrP^{Sc}

Table 3 : Fonctions et profils d'expression de quelques membres de la famille C1q

Table 4 : Comparaison par alignement de séquences (Blastp) des têtes globulaires de Cbln1 et de C1q

TABLE DES ABRÉVIATIONS

AFSSaPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel
cDC : cellules dendritiques conventionnelles
CJD : maladie de Creutzfeldt-Jakob
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
EEG : électroencéphalogramme
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
EST : Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
gC1q : domaine globulaire des protéines de la famille C1q
GPI : glycosyl-phosphatidylinositol
GSS : syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
IFF : Insomnie Fatale Familiale
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
NCBI : National Center for Biotechnology Information
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PC : cellules de Purkinje
PF : fibres parallèles des cellules granulaires du cervelet
PMCA : Protein Misfolding Cyclic Amplification
PrP : protéine prion recombinante
PrP^C : cellular prion protein
PrP^{res} : PrP résistante à la protéolyse = PrP^{Sc}
PrP^{Sc} : scrapie prion protein
PrP^{sens} : PrP sensible à la protéolyse = PrP^C
SEC : Size Exclusion Chromatography (chromatographie d'exclusion de taille)
SNC : Système Nerveux Central
SOD : superoxyde dismutase
SPR : Résonance Plasmonique de Surface
TCR : T-cell Receptor
vCJD: variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les maladies à prion

Les maladies à prion, ou Encéphalites Spongiformes Transmissibles (EST) sont des syndromes neurodégénératifs toujours fatals, qui touchent aussi bien les animaux que l'homme. Elles ont la particularité de pouvoir se présenter sous forme sporadique, familiale ou acquise. Toutes sont caractérisées par l'accumulation dans le cerveau de la protéine PrP^{Sc} sous forme de plaques amyloïdes.

1.1. Historique

Décrite en Europe depuis la première moitié du XVIII^e siècle, la tremblante du mouton entraînait des pertes importantes pour l'industrie anglaise de la laine. Sur le plan clinique, elle se caractérise par des troubles locomoteurs, des démangeaisons importantes (d'où le terme anglophone «scrapie») et des tremblements. L'examen de coupes histologiques de cerveaux d'animaux infectés montre une importante perte neuronale, qui donne véritablement au cerveau un aspect d'éponge. Cet aspect est à l'origine du terme d'«encéphalite spongiforme», utilisé pour décrire cette maladie. Les lésions se répartissent dans l'ensemble du système nerveux central (SNC), mais touchent surtout le cervelet, qui est responsable de la coordination des mouvements et de l'équilibre. Cette atteinte du cervelet explique les symptômes locomoteurs de la tremblante. En inoculant des homogénats de cerveaux d'animaux morts de tremblante, Cuillé et Chelle réussissent la transmission expérimentale de la tremblante du mouton à la chèvre dès 1936. Ils suggèrent donc le caractère infectieux de cette pathologie. En 1939, cette hypothèse sera fortuitement confirmée par l'apparition de la tremblante chez bon nombre de moutons vaccinés contre une encéphalite virale par des extraits de cerveaux de moutons contaminés.

Par ailleurs, H.G. Creutzfeldt publie en 1920 l'étude d'une encéphalopathie humaine avec dermatose herpétiforme. L'étude neuropathologique montre une perte neuronale et une gliose, mais aucune spongiose n'est observée. A. Jakob publie trois cas similaires l'année suivante. L'éponyme de «maladie de Creutzfeldt-Jakob» (CJD) est alors rapidement proposé pour décrire ce tableau .

Le kuru est la première encéphalite spongiforme décrite chez l'homme. Elle est liée aux rites anthropophagiques de la tribu Fore de Papouasie-Nouvelle-Guinée. Dans un article paru dans Lancet en 1959, le vétérinaire W.J. Hadlow fait le rapprochement entre la tremblante du mouton et le kuru. En effet, le délai d'incubation et les symptômes des deux maladies sont très similaires. De plus, on observe dans les deux cas un aspect spongiforme du cerveau sur les coupes histologiques [31].

L'équipe de Gajdusek prouvera le caractère infectieux du kuru en 1966 puis de la CJD en 1968. En effet, des chimpanzés inoculés par des homogénats de cerveaux de patients malades ont développé une encéphalite spongiforme [26, 29] (prix Nobel de médecine 1976, «pour ses découvertes sur de nouveaux mécanismes de dissémination des maladies infectieuses»).

Les études d'inactivation de l'agent de la tremblante ont été une étape cruciale dans l'identification de l'agent. Iain Pattison montre la résistance exceptionnelle de l'agent de la tremblante à la chaleur et au formaldéhyde [50]. En 1966, Tikvah Alper observe que l'agent résiste aussi à des rayonnements ultraviolets très énergétiques. Il suggère que l'agent pathogène pourrait se répliquer sans contenir d'acide nucléique [2]. A l'époque, cette idée va à l'encontre de tous les dogmes de la biologie cellulaire. On parle d'Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC) pour désigner l'agent infectieux de la tremblante. Les essais de transmission de la maladie montrent que le SNC est l'organe présentant le titre infectieux le plus élevé [32].

Un tournant est franchi en 1982. Le groupe de Prusiner mène de nombreuses tentatives de purification de l'agent infectieux à partir de cerveaux de hamsters syriens inoculés avec l'agent de la tremblante. Il montre que le principal élément infectieux systématiquement isolé des cerveaux infectés est constitué d'une protéine hydrophobe, insoluble dans les détergents et partiellement résistante à la protéolyse [54]. De plus, celle-ci s'accumule proportionnellement au titre infectieux. Prusiner dénomme cette protéine le prion (*small proteinaceous infectious particle*). La démonstration de l'accumulation du prion dans le cerveau permet aujourd'hui sans équivoque de classer une pathologie dans le groupe des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) ou «maladies à prion». Le prion est identifié comme étant

une protéine de l'hôte. Prusiner émet l'hypothèse que cette protéine prion, ou PrP, codée par un gène unique, est présente sous deux conformations alternatives : la forme cellulaire normale ou PrP^C et la forme associée à la pathologie ou PrP^{Sc} [5] (prix Nobel de médecine 1997, «pour sa découverte des prions - un nouveau principe biologique d'infection»). Bueler, et al. confortent cette hypothèse en 1993 en montrant que les souris dont le gène de la PrP a été invalidé ne développent pas la maladie après inoculation par le prion [11]

Depuis les années 1980, les EST humaines et animales ont connu un regain d'intérêt considérable, alors qu'elles étaient jusqu'alors presque ignorées du milieu médical. Ceci s'explique principalement par l'impact médiatique sans précédent qu'ont eu, d'une part, la contamination d'enfants par l'hormone de croissance humaine en 1985 et, d'autre part, l'apparition de l'Encéphalite Spongiforme Bovine (ESB) en 1986, puis celle du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) en 1995.

1.2. Diagnostic des maladies humaines à prion

1.2.1. Suspicion clinique

Bien qu'il n'existe encore aucune thérapeutique curative, il est capital que le diagnostic de maladie humaine à prions soit évoqué rapidement. Cela doit permettre d'optimiser la prise en charge du patient et de mettre en place les précautions d'hygiène liées à la résistance particulière de l'agent infectieux aux procédés conventionnels de décontamination. De plus, l'existence d'un marqueur biologique à la fois sensible, spécifique et surtout précoce faciliterait grandement la mise en place de futurs essais cliniques.

Dans un objectif de veille sanitaire, depuis 1996, les suspicions de maladie de Creutzfeldt-Jakob et autres encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles humaines, sont inscrites sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. Environ mille cas suspects sont déclarés tous les ans auprès de l'Institut National de Veille Sanitaire. En moyenne, cent vingts cas sont confirmés dans l'année, suite au décès du patient.

La suspicion de la maladie à prion repose au départ sur l'apparition de troubles de l'humeur, de troubles cognitifs d'évolution rapide ou des signes neurologiques évocateurs, tels que des myoclonies, une ataxie cérébelleuse, ou des troubles visuels. Cette suspicion doit amener à proposer des examens complémentaires.

1.2.2. Imagerie

Les examens d'imagerie ne permettent en aucun cas de poser formellement le diagnostic de maladie à prion. En revanche, ils sont nécessaires afin d'éliminer d'autres diagnostics associés au tableau clinique peu spécifique associé à ces maladies.

- électroencéphalogramme (EEG) : les tracés anormaux n'apparaissent qu'après quelques semaines d'évolution et ne durent que quelques semaines. L'observation de complexes pointes-ondes paroxystiques est un critère consensus pour le diagnostic de CJD sporadique [14, 70].
- imagerie par résonance magnétique (IRM) : peut montrer une image normale ou une atrophie cérébrale. L'observation d'hypersignaux à la fois dans le putamen et dans le noyau caudé ou dans au moins deux régions corticales (parmi les région temporale, pariétale et occipitale) a été retenu récemment comme critère pour le diagnostic de CJD sporadique [70].
- scanner cérébral : il est peu spécifique car il peut montrer une image normale ou une atrophie cérébrale

1.2.3. Biologie

La biologie peut être utile en seconde intention, si l'imagerie ne permet pas de poser un autre diagnostic. Les bilans biologiques sanguins de routine sont sans anomalie. On ne retrouve ni syndrome inflammatoire ni d'autre désordre immunologique.

Actuellement, la ponction lombaire reste le prélèvement le plus utilisé car un certain nombre de marqueurs reflète les anomalies histologiques cérébrales. En routine clinique, on recherche dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) la protéine 14.3.3 et la protéine tau.

- *Recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR par western-blot.* Ce marqueur a une très bonne sensibilité (>90%) pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob [34]. Un résultat négatif doit toutefois conduire à un nouveau prélèvement quelques semaines plus tard. La protéine 14.3.3 a des rôles très divers : transduction de signaux mitogènes, apoptose, contrôle du cycle cellulaire, etc. [24]. Cependant, la signification physiopathologique de la présence de cette protéine de 30 kDa dans le LCR reste inconnue. Cette recherche est effectuée dans les laboratoires associés au réseau national de surveillance des maladies de Creutzfeldt-Jakob et maladies apparentées (<http://creutzfeldt-jakob.aphp.fr>). Des faux positifs sont possibles dans de nombreuses situations. Il s'agit de pathologies neurologiques diverses : accident vasculaire cérébral, sclérose en plaques, hémorragie méningée, encéphalites infectieuses, syndrome paranéoplasique, encéphalopathie toxique, etc. Cependant, le tableau clinique de ces pathologies diffère singulièrement des maladies à prion. Par conséquent, le dialogue clinico-biologique est un élément essentiel dans le diagnostic.
- *Recherche de la protéine tau dans le LCR par ELISA.* tau est une protéine associée aux microtubules, qui est fortement exprimée dans les axones des neurones. Son taux dans le LCR augmente en cas de lyse neuronale, telle qu'elle peut être observée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, mais aussi dans les accidents vasculaires cérébraux et la maladie d'Alzheimer. L'association de la recherche de la protéine tau et de la protéine 14.3.3 augmente sensiblement la valeur diagnostique de chacune d'entre elles.

D'autres biomarqueurs du LCR, tels que la Neuron Specific Enolase et la protéine S100, ont été proposés mais aucun ne présente les avantages des précédents [8].

Singh, et al. ont proposé très récemment un nouveau biomarqueur pré-mortem de vCJD sporadique : le taux de transferrine dans le LCR. La mise en évidence de la baisse de ce taux améliore notablement la sensibilité et la spécificité de la recherche de la protéine tau, lorsqu'elle lui est associée. La

positivité associée des deux tests a une valeur prédictive positive de plus de 90% [59].

Pour finir, toute suspicion de maladie à prion devrait, dans la mesure du possible, s'accompagner d'une étude génétique. En effet, la mise en évidence d'une mutation dominante dans le gène PRNP, qui code pour PrP^C, permet d'affirmer l'étiologie génétique de la maladie et d'exclure d'autres causes. Il existe de nombreux cas de mutations *de novo* qui se transmettent ensuite sur le mode autosomique dominant. Il est donc nécessaire d'effectuer cette recherche même en l'absence d'histoire familiale. Par ailleurs, l'étude génétique du patient permet de génotyper le codon 129 de PRNP. L'homozygotie sur ce locus est un facteur de risque pour l'apparition de maladies à prion.

1.2.4. Diagnostic de certitude

Le seul diagnostic de certitude ne peut être réalisé que post-mortem, avec l'autorisation de la famille. En effet, ce diagnostic repose sur la mise en évidence pathognomonique du prion, c'est-à-dire de PrP^{Sc}, dans le tissu cérébral.

La mise en évidence du prion est le plus souvent réalisée par immunocytochimie et par Western-Blot après protéolyse limitée par la protéinase K. D'une part, l'immunocytochimie permet à la fois de localiser les dépôts de PrP^{Sc} et d'observer le tableau lésionnel. Celui-ci est caractéristique et réunit classiquement la triade des maladies à prions : gliose astrocytaire, spongiose et perte neuronale. D'autre part, le Western-Blot permet de classer la protéine selon son poids moléculaire et son profil de glycosylation (classification de Parchi et Gambetti [49]). Cette information a un intérêt principalement épidémiologique.

En 2003, Zanusso, et al. ont mis en évidence des dépôts de PrP^{Sc} au niveau du neuro-épithélium de la muqueuse olfactive, sur les prélèvements post-mortem de neuf patients atteints de CJD sporadique (sur neuf patients testés). Aucun échantillon contrôle n'était positif (patients sains ou atteints de diverses maladies neurologiques) [69]. La biopsie nasale serait donc un

prélèvement facilement accessible et qui faciliterait le diagnostic de CJD sporadique.

Il existe toutefois un cas particulier et unique au décours duquel un diagnostic de quasi-certitude peut déjà être posé du vivant du malade. Le vCJD est une forme acquise de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, liée à la consommation de viande bovine contaminée. Chez les patients suspects de vCJD, et uniquement dans ce cas, le prion est détectable par immunocytochimie dans les organes lymphoïdes secondaires périphériques, notamment dans les amygdales. L'importance des mesures d'hygiène face au prion sont ici à souligner (cf paragraphe 1.6).

1.3. Présentations cliniques des maladies humaines à prion

1.3.1. Formes sporadiques

La forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jacob est la plus fréquente (80% des cas d'encéphalopathies spongiformes transmissibles). Elle reste pourtant une maladie rare, dont la prévalence et l'incidence en France sont respectivement évaluées à 1,5 pour 1 million et 100 nouveaux cas par an.

L'âge moyen d'apparition de la maladie est tardif (68 ans), avec quelques formes juvéniles très rares. Les premiers signes ne sont pas spécifiques, si bien qu'ils ne sont souvent retrouvés que de manière rétrospective : altération de l'état général, anxiété, insomnie.

La phase d'état présente des symptômes très variés, si bien que les tableaux cliniques en début de maladie peuvent beaucoup différer d'un patient à l'autre. Les symptômes les plus fréquents sont la démence (98% : troubles de la mémoire, de l'orientation spatio-temporelle, du langage, des gestes ou de la reconnaissance), des myoclonies diffuses (97%), un syndrome cérébelleux avec ataxie (75%), des troubles visuels (60%), un syndrome pyramidal (45%) et/ou extra-pyramidal. L'évolution de la maladie est très rapide. Les troubles végétatifs et l'ataxie cérébelleuse s'aggravent. Les patients perdent leur indépendance et présentent fréquemment un mutisme akinétique en phase terminale (50%). La maladie est fatale en 4,5 mois en moyenne. L'espérance de vie n'excède pas un an dans 90% des cas.

Le génotypage du codon 129 de la *PRNP* présente un intérêt particulier, notamment épidémiologique. En effet, la distribution des génotypes est différente dans la population atteinte de la maladie et dans la population témoin. Les patients homozygotes MM sont plus susceptibles de développer la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jacob. (table 1).

	MM	VV	MV
Témoins	39 %	11 %	50 %
CJD sporadique	64 %	19 %	17 %

Table 1 : Génotypes du codon 129 de *PRNP* dans la population atteinte de CJD sporadique et dans la population . M, Méthionine. V, Valine.

<p>A. Signes cliniques :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. démence 2. cérébelleux ou visuels 3. pyramidaux ou extra-pyramidaux 4. mutisme akinétique <p>B. Tests diagnostiques :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. complexes pointes-ondes paroxystiques à l'EEG 2. détection de la protéine 14.3.3 dans le LCR (chez les patients dont la durée de la maladie n'excède pas 2 ans) 3. hypersignaux dans les noyaux caudés et le putamen ou dans au moins deux régions corticales (temporale, pariétale ou occipitale) en DWI ou en FLAIR <p>Diagnostic probable deux critères parmi A + un critère parmi B</p> <p>Diagnostic possible deux critères parmi A et durée de la maladie inférieur à 2 ans</p>

Figure 1 : Critères consensus du consortium MRI-CJD pour le diagnostic de CJD sporadique

La présomption du diagnostic reste donc difficile et seul l'examen neuropathologique post-mortem permet le diagnostic de certitude. Des critères cliniques et paracliniques ont donc été proposés et permettent de classer les diagnostics en cas probables ou cas possibles (figure 1). La certitude du diagnostic ne peut toujours être établie que par mise en évidence du prion dans le tissu cérébral. Actualisés en 2009, ces critères doivent permettre d'aider à ne pas retarder la prise en charge des patients et la mise en place des mesures de protection contre le risque infectieux lié au prion. Ces critères ne sont pas décisifs, mais ont toutefois une excellente sensibilité (98%) et une assez bonne spécificité (70,8%) [70]

1.3.2. Formes familiales

Ces formes sont plus rares (10-15%). Leur transmission est autosomique dominante, à pénétrance souvent incomplète. Toutes sont liées à des mutations de type substitutions ou insertions qui peuvent toucher l'ensemble du gène *PRNP*, localisé sur le bras court du chromosome 20. Près d'une trentaine de mutations sont recensées,

Parmi les formes familiales, différents critères génétiques, cliniques, évolutifs et neuropathologiques permettent d'identifier plusieurs entités distinctes :

- CJD familiale : le tableau clinique et l'évolution sont comparables à la forme sporadique de la maladie, mais les premiers symptômes apparaissent plus précocement [22].
- Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) : l'examen neuropathologique présente des plaques amyloïdes de PrP^{Sc} particulières, dites «multicentriques», qui justifient de la dénomination différente de cette entité. Le tableau clinique et l'évolution de la maladie diffèrent selon la mutation du gène. La transmissibilité du GSS n'a pu être prouvée que dans le cas où il est lié à la mutation la plus fréquente P102L [61].
- Insomnie Fatale Familiale (IFF) : les symptômes apparaissent vers 50 ans et associent insomnie rebelle, troubles végétatifs (pertes des cycles de veille/sommeil, hyperactivité sympathique, troubles sphinctériens) et démence tardive. L'EEG de sommeil présente des anomalies

caractéristiques, mais non spécifiques. Une mutation du codon 178 jointe, sur le même allèle, à un codon 129 codant pour un résidu méthionine est toujours associée à la maladie : alors que le génotype D178N-129MM (homozygotie méthionine au codon 129) est généralement associé au tableau d'IFF, le génotype D178N-128MV (hétérozygotie méthionine-valine au codon 19) ségrège avec la CJD familiale. L'issue reste fatale après 6 à 32 mois d'évolution [51].

Aucun traitement ne permet encore de modifier l'évolution de ces maladies [51].

1.3.3. Formes acquises (infectieuses ou iatrogènes)

Ces formes restent tout à fait exceptionnelles. Elles représentent moins de 1% des cas. Le point d'entrée de l'agent infectieux peut être à proximité du SNC (greffes de cornée ou de dure-mère, électrode ou instrument mal stérilisé) ou à distance (voie orale ou parentérale).

Le premier cas de contamination proximale a été décrit en 1974, suite à une greffe de cornée [19]. La description de ce type de cas acquis iatrogènes est à l'origine d'une révision profonde des processus de stérilisation du matériel chirurgical et des mesures d'hygiène encadrant la prise en charge des patients suspects d'encéphalopathie spongiforme transmissible (cf. paragraphe 1.6.3).

Les premiers cas décrits de transmission de maladie à prion par voie orale sont des cas de Kuru, une maladie liée à un rite funéraire anthropophage de la tribu Fore de Papouasie-Nouvelle-Guinée [27]. Les femmes et les enfants, qui consommaient le cerveau étaient les plus touchés, alors que les hommes, à qui revenaient les muscles, l'étaient moins. La période d'incubation est très variable. Si la majorité des cas recensés s'est déclarée dans les quatre ans, certains se sont déclarés plus de cinquante ans après l'interdiction du cannibalisme par l'autorité australienne. Les individus hétérozygotes M/V au niveau du codon 129 avaient une période d'incubation plus longue. Les symptômes de la maladie du Kuru sont relativement stéréotypés, contrairement à la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (ataxie

cérébelleuse, mouvements anormaux, dysarthrie pouvant aller jusqu'au mutisme, syndrome extra-pyramidal). Le décès intervient en moins d'un an.

Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) est une autre forme acquise d'EST, dont la description est la plus récente (1995). Elle a été rapidement reliée à l'épidémie de la maladie dite de la «vache folle» ou d'ESB, qui l'a précédée d'une dizaine d'années [10, 13]. De manière encore inexpliquée, les patients touchés sont jeunes (29 ans en moyenne selon l'OMS). La durée d'incubation de la maladie est très variable, allant de quelques mois à plusieurs dizaines d'années, et est en moyenne deux ans plus courte chez les individus de sexe féminin [42]. Elle associe des troubles psychiatriques à des douleurs intenses des membres et du visage puis une ataxie cérébelleuse, de discrètes myoclonies et, en phase terminale, un mutisme akinétique. Tous les patients recensés sont homozygotes M/M au codon 129 de la *PRNP*. On ne peut toutefois pas formellement exclure quelques cas tardifs chez des hétérozygotes M/V ou des homozygotes V/V, si on suppose que le temps d'incubation est plus long ceux-ci [64].

Une contamination par voie parentérale a été décrite dans le contexte des traitements par hormone de croissance humaine purifiée à partir d'hypophyses humaines, utilisée jusqu'en 1988. Plus de deux tiers des cas recensés dans le monde ont été déclarés en France (115 cas déclarés depuis 1992 [37]). Après une incubation de plus de dix ans, les patients présentent d'abord une ataxie cérébelleuse, des troubles oculomoteurs, des troubles du comportement, des céphalées et des insomnies. Rapidement, apparaissent un syndrome pyramidal et une démence. Le décès intervient rapidement, en 18 mois en moyenne.

Aujourd'hui, l'inquiétude est grandissante vis-à-vis du risque transfusionnel. Ce risque a été objectivé en 2002 par des expériences de transmission de l'agent de l'ESB et de la tremblante du mouton par transfusion sanguine entre moutons de la même espèce. Parmi 17 moutons transfusés par du sang total de moutons contaminés par voie orale par des homogénats de cerveau de vaches atteintes d'ESB, 4 moutons ont développé des symptômes d'EST. D'autre part, sur 21 moutons transfusés par du sang total de moutons atteints de tremblante, 4 ont développé des symptômes de tremblante [35].

Depuis, quatre cas probables de vCJD chez des patients transfusés ont

été décrits au Royaume-Uni. Les culots globulaires qui leur avaient été transfusés venaient de donneurs asymptomatiques décédés des suites du vCJD, quelques années après le don. En 2010, du prion a été détecté post-mortem dans la rate d'un patient hémophile qui n'avait pas développé de symptôme d'EST, mais qui avait reçu des concentrés de facteur VIII. Ces concentrés sont un produit dérivé de pools de plasma. Le patient avait reçu un concentré produit à partir d'un pool dont un donneur s'est révélé par la suite atteint du vCJD [38]. Il est actuellement impossible de dire combien de patients ont reçu des produits sanguins potentiellement infectieux. La surveillance épidémiologique est donc accrue.

1.4. Perspectives thérapeutiques

1.4.1. Essais thérapeutiques

Il n'existe à ce jour aucun traitement qui ait fait formellement ses preuves face aux maladies à prion.

Dans le cas des EST acquises, et au vu de la longue durée d'incubation de ces maladies, on peut imaginer un traitement qui, administré suffisamment tôt, évite la neuro-invasion. Il n'existe encore aucun test diagnostique suffisamment fiable et précoce afin de mettre en place des essais thérapeutiques ou prophylactiques. C'est pourquoi le diagnostic est une priorité dans la recherche sur les maladies à prions.

Malgré cet écueil, plusieurs molécules ont été évaluées, mais sont restées décevantes. Parmi elles, la flupirtine, la quinacrine et le pentosan n'ont pas ou pas encore apporté de résultats concluants. Ils sont toutefois parfois prescrits en France à titre compassionnel. En revanche, il semblerait que les tétracyclines, des antibiotiques largement utilisées aujourd'hui (infections par bactéries intracellulaires, paludisme, syphilis, acné, etc.), donnent des résultats prometteurs. Elles interagissent en effet avec la PrP^{Sc} extraite de cerveaux de patients infectés, rétablissent sa sensibilité aux protéases et diminuent son pouvoir infectieux. L'injection intra-cérébroventriculaire de minocycline encapsulée dans des liposomes augmente la survie du hamster d'environ 10% [15]. Actuellement, un essai thérapeutique en double aveugle versus placebo est actuellement conduit simultanément en France, en Italie et en Allemagne. Son objectif principal est d'évaluer l'effet de l'administration de doxycycline

par voie orale (100 mg/j) sur la survie dans les cas suspects de maladies de Creutzfeldt-Jakob. L'étude tient compte du polymorphisme du codon 129 de la *PRNP* comme co-variable. Commencée en janvier 2009, elle est prévue pour une durée de quatre ans.

1.4.2. Avancées théoriques

Malgré la très faible prévalence de ces maladies, la recherche reste dynamique en vue d'obtenir des traitements efficaces. Les stratégies thérapeutiques étudiées sont basées sur les connaissances de la biologie cellulaire du prion.

Comme nous le détaillerons plus tard, le prion (ou PrP^{Sc}) se propage en imprimant sa conformation tridimensionnelle à la protéine prion constitutionnelle exprimée par l'hôte : PrP^C.

En 2003, Mallucci, et al. ont publié un étude surprenante chez un modèle murin transgénique de PrP^C-KO inductible, c'est-à-dire dont on peut éteindre l'expression du gène PrP^C après la naissance. La déplétion en PrP^C, après l'apparition des premiers symptômes cliniques d'infection, permet d'inverser l'évolution de la maladie. Les symptômes précoces ainsi que les premiers signes neuropathologiques sont réversibles [44]. Il n'est donc pas exclu qu'un traitement puisse être efficace, même lorsque la maladie s'est déjà déclarée. Trois applications potentielles découlent de cette observation :

- *Déplétion en PrP^C, en tant que matrice de propagation du prion.* Cette possibilité est rendue accessible grâce aux développements récents de l'interférence ARN, un moyen extrinsèque de diminuer, voire d'éteindre l'expression d'un gène. Cette stratégie thérapeutique présente un inconvénient majeur. Statistiquement, il y a près de 10% de risque que cette méthode interfère avec d'autres gènes ayant des séquences similaires. La balance bénéfice-risque de cette stratégie est donc à optimiser.

- *Prévention secondaire via immunisation passive par anticorps monoclonal.* Des essais prometteurs ont été mené chez la souris par White, et al. Des souris ont été inoculées par des homogénats de cerveaux d'autres souris atteintes de scrapie. Elles ont ensuite été traitées par des injections intrapéritonéales et répétées d'un anticorps monoclonal anti-PrP. Le traitement commence à partir du 7^{ème} ou du 30^{ème} jour post-inoculation. Ces temps

correspondent respectivement au délai minimum pour que le prion soit détectable dans la rate et pour que le taux de prion dans la rate atteigne son maximum. Dans ces deux groupes, on observe une réduction drastique de la quantité de PrP^{Sc} détectable dans la rate et un allongement de la survie des souris par rapport à des souris non traitées. Toutefois, le traitement est inefficace si les premiers symptômes sont apparus avant le traitement ou si l'inoculation est effectuée par voie intracérébrale [66]. Cela témoigne probablement d'un mauvais passage de l'anticorps monoclonal au travers de la barrière hémato-encéphalique. L'amélioration des performances pharmacocinétiques de cet anticorps est donc un enjeu majeur.

- *Prévention secondaire via immunisation passive par aptamères.* Les aptamères sont un nouveau moyen d'explorer cette stratégie de prophylaxie post-exposition. Découverts dans les années 1990, les aptamères (du latin «aptus», qui signifie «lier») sont devenus une des molécules les plus largement étudiées. Ces oligonucléotides d'ADN ou d'ARN simple brin se lient à des molécules organiques ou inorganiques avec une haute affinité. Leurs avantages vis-à-vis des anticorps sont multiples. D'abord, leur coût de production est sensiblement moins élevé. Ensuite et surtout, ils offrent la possibilité de modifications chimiques en vue d'améliorer leur pharmacocinétique (demi-vie, biodisponibilité, distribution). Les aptamères ont donc de nombreux potentiels de développement, aussi bien en thérapeutique, qu'en diagnostic. Leur intérêt dans la recherche sur le prion est donc majeur. En 2002, Proske, et al. ont mis au point un aptamère ARN résistant aux protéases qui empêche *in vitro* la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}. Cet aptamère constitue potentiellement le chef de file d'une nouvelle classe thérapeutique contre les maladies à prion [53].

Aujourd'hui, malgré toutes ces avancées théoriques, aucun traitement n'a fait clairement ses preuves. En attendant, le traitement des EST reste encore principalement symptomatique.

1.5. Prise en charge du patient

Puisqu'aucun traitement curatif n'est encore disponible, la prise en charge reste avant tout sociale, psychologique et palliative. Les conséquences

psychologiques et sociales des maladies à prion rendent la prise en charge des patients particulièrement délicate. Afin de favoriser l'information des médecins, d'améliorer l'accompagnement des patients et de leurs familles, et de répondre à leurs questions, le ministère des Solidarités, de la Santé et des Familles a diffusé la circulaire DGS/DHOS/DGAS/DSS n°2001-139 du 14 mars 2001, relative à la prise en charge des personnes atteintes d'encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles. La cellule nationale de référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière) a été créée à cette occasion. Son objectif n'est pas de prendre directement en charge les patients, mais d'informer et de guider les médecins dans leurs démarches diagnostiques, sociales et officielles, dès la suspicion du diagnostic.

Le diagnostic ne doit être annoncé qu'en cas de forte suspicion. Cette annonce repose sur le médecin en charge du patient et de sa famille et doit être immédiatement accompagnée d'une assistance psychologique et sociale. Dès lors, il est recommandé que l'ensemble de la prise en charge soit coordonnée par un référent unique choisi par l'équipe soignante en accord avec le patient et sa famille. Assistant social ou soignant, ce référent aura en charge d'accompagner le patient dans ses démarches. Il s'agit notamment d'évaluer les besoins et de faciliter la communication entre soignants, l'accès aux aides psychologiques, financières et sociales. Il est l'interlocuteur de choix pour l'ensemble des intervenants, y compris la cellule nationale de référence. Le référent aide la famille à organiser les soins, la vie quotidienne, le soutien psychologique et doit permettre de prévoir la prise en charge de la douleur en soins palliatifs.

L'ensemble des soins liés aux maladies à prion est pris en charge à 100% par l'Assurance Maladie au titre des affections de longue durée (liste des ALD 30).

Il est essentiel d'évoquer l'accompagnement des familles dans leur deuil. Celui-ci peut être pris en charge par le psychologue, aidé par les associations de malades. L'équipe soignante doit évoquer la question de l'autopsie avant le décès. En effet, il s'agit toujours du seul examen permettant

d'établir un diagnostic formel d'EST. L'autopsie permet donc d'apporter des réponses définitives aux familles, mais il est aussi le meilleur moyen d'effectuer la surveillance épidémiologique, indispensable pour la recherche sur ces maladies.

1.6. Prévention du risque iatrogène

1.6.1. Risques connus

La description d'accidents iatrogènes a conduit à interdire plusieurs types de soin. Ainsi, l'hormone de croissance purifiée d'origine humaine est interdite depuis 1988, et est remplacée par l'hormone de croissance recombinante. Les greffes de dure-mère allogéniques sont interdites depuis octobre 1994. Seules les autogreffes et greffes de tissus synthétiques restent possibles. Enfin, la sélection des donneurs de cornées est très encadrées et doit exclure tout patient à risque de maladie à prion.

1.6.2. Infections nosocomiales

Le prion pose un problème d'hygiène très particulier en raison de sa résistance exceptionnelle aux procédés conventionnels d'inactivation [17]. Il est notamment résistant aux :

- agents physiques (chaleur, dessiccation, ultrasons, radiations ionisantes, UV)
- agents chimiques (permanganate de potassium, formaldéhyde, glutaraldéhyde, bêta-propionolactone, peroxyde d'hydrogène, ionophores, acide peracétique, oxyde d'éthylène)
- agents biologiques (nucléases, protéases, phospholipases)

La seule méthode de stérilisation validée face au prion est l'autoclavage à 134°C pendant au moins 18 minutes. Selon l'OMS, seule l'incinération garantit l'élimination de l'infectivité. Une étude plus récente montre l'intérêt de protéases recombinantes thermostables pour l'inactivation du prion. Un variant recombinant de la subtilisine de *Bacillus lentus* réduit de 7 log l'infectivité d'un homogénat de cerveau de souris infectée par le prion [18].

La prise en compte du risque prion dans la prise en charge des patients est encadrée par la circulaire DGS/DHOS/DGAS/DSS n°2001-138 du 14 mars

2001, relative aux précautions à observer lors de soins en vue de réduire les risques de transmission d'agents transmissibles non conventionnels. Cette circulaire rappelle les recommandations officielles sur les mesures d'hygiène entourant les patients suspects de maladie à prion. Elle intègre notamment les risques liés au nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, au décours duquel l'infectivité peut être retrouvée dans l'ensemble des tissus lymphoïdes périphériques. Elle s'appuie sur les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) émises en septembre 2000. Le niveau de risque y est classé en fonction de caractéristiques liées aux patients et en fonction de la nature de l'acte de soin.

1.6.3. Hémovigilance

Les cas décrits de probable transmission du prion par transfusion sont très rares. Cependant, malgré un risque qui apparaît très faible, le principe de précaution conduit à en tenir compte de façon stricte dans la gestion des transfusions.

L'hémovigilance est un élément de la sécurité transfusionnelle et a pour objet la surveillance, l'évaluation et la prévention des incidents et des effets indésirables survenant chez les donneurs ou les receveurs de produits sanguins labiles (définition de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS)). Dans ce cadre, le risque prion pose deux problèmes particuliers. D'abord, aucun test de dépistage n'est encore validé chez l'homme. Ensuite, il n'existe aucune méthode d'inactivation du prion applicable aux produits sanguins labiles, très fragiles.

Par conséquent, l'exclusion de donneurs de sang à risque reste la seule mesure applicable. Le questionnaire et l'entretien médical qui précèdent le don doivent permettre d'exclure les donneurs ayant été traité par l'hormone de croissance humaine, ceux ayant des antécédents familiaux au 1er degré de CJD, ceux ayant reçu une greffe de cornée ou de dure-mère, et ceux ayant subi une intervention neurochirurgicale invasive. Les donneurs ayant séjourné au Royaume-Uni entre 1980 et 1996 sont exclus depuis 2001. Les patients ayant été transfusés ne sont pas considérés comme une population à risque, compte tenu du faible risque ajouté par rapport à la population, générale.

La traçabilité permet de détruire et de rappeler les produits sanguins labiles et le plasma de patients devenus suspects de CJD. Compte tenu du temps d'incubation de la maladie, il s'agit en fait surtout de retrouver les patients ayant reçu ces produits sanguins.

2. Le prion et ses partenaires d'interaction

2.1. Les protéines prion

PrP^{Sc} (Scrapie Prion Protein) ou PrP^{res} (en raison de sa résistance à la protéolyse) est l'isoforme pathologique d'une «protéine prion» constitutive et exprimée par le génome de l'hôte. Celle-ci est dénommée PrP^C (Cellular Prion protein) ou PrP^{sens} (car elle est sensible à la protéolyse). Selon l'hypothèse du «tout protéique» proposée par Stanley Prusiner en 1982, l'agent pathologique des EST, ou «prion» serait constitué principalement, voire intégralement, de PrP^{Sc}, qui est mise en évidence dans toutes les EST.

2.1.1. Protéine prion cellulaire, PrP^C

1. Gène de la protéine prion

Le gène de la protéine prion, nommé *PRNP* chez l'homme et *prnp* chez la souris a été localisé respectivement sur le bras court du chromosome 20 et sur le chromosome 2 [47]. Il est constitué d'un promoteur et d'un à trois exons selon l'espèce. Le dernier exon contient l'intégralité de la séquence codante, ce qui élimine toute possibilité d'épissage alternatif pour la synthèse de la protéine.

2. Structure

PrP^C est une glycoprotéine de 32 kDa, composée de 253 acides aminés chez l'homme et de 254 chez la souris (figure 2).

Sa partie amino-terminale est flexible et peu structurée. Elle contient cinq répétitions de huit acides aminés, appelée région des octa-repeats (résidus 51 à 91). Celle-ci a la propriété de lier fortement le cuivre grâce à quatre résidus histidine.

Sa partie carboxy-terminale présente une structure globulaire constituée de trois hélices α (42% des acides aminés) et de deux brins β antiparallèles (3% des acides aminés). Elle est stabilisée par un pont disulfure entre les

hélices 2 et 3. La molécule est ancrée à la membrane cellulaire grâce à son ancre GPI carboxy-terminale (figure 3).

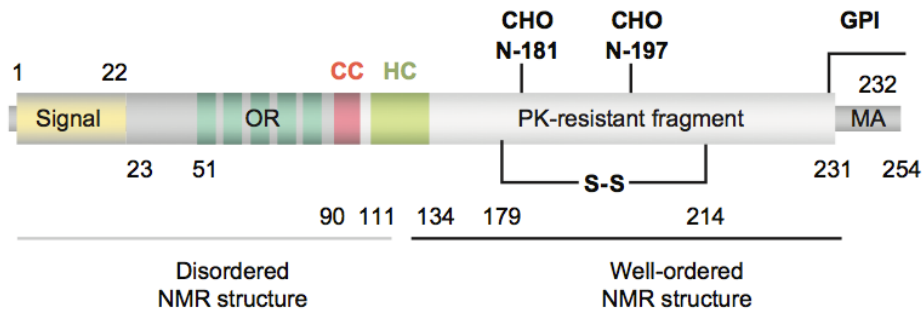


Figure 2 : Représentation schématique de la structure primaire de la PrPC et de ses modifications post-traductionnelles.

Signal : peptide signal ; OR : octapeptides ; CC : cluster chargé ; HC : cœur hydrophobe ; S-S : pont disulfure ; MA : ancrage à la membrane ; GPI : glycosyl-phosphatidylinositol ; CHO : sites de N-glycosylation. D'après [1].

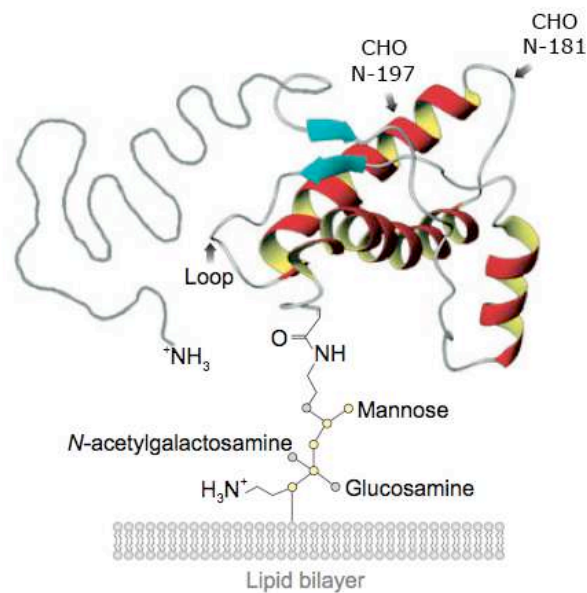


Figure 3 : Structure tertiaire de la PrPC déterminée par RMN, ancrée dans une bicouche lipidique. Les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β anti-parallèles en turquoise. Les résidus osidiques sont représentés par les petits cercles colorés. La région non structurée N-terminale est représentée en gris. CHO : sites des N-glycosylation. D'après [1].

3. Propriétés biochimiques

PrP^C est soluble dans les détergents, sensible aux protéases et est complètement digérée par la protéinase K. Dans des conditions physiologiques, elle est très peu auto-agrégable et n'a aucune tendance à polymériser.

4. Fonction biologique

L'expression de PrP^C est très conservée au cours de l'évolution des mammifères. Cela suggère une fonction biologique importante de cette protéine. Pourtant, les souris *prnp*^{0/0} dont le gène codant pour PrP^C est invalidé ne développent aucune pathologie phénotypiquement évidente, indiquant que PrP n'est indispensable ni au développement ni à la survie des souris [12, 45].

Toutefois, différentes publications ont montré que l'expression de PrP chez la souris influence plusieurs processus cellulaires, dont la survie neuronale, la croissance des neurites (dendrites et axones des neurones), ainsi que la formation, la maintenance et la fonction des synapses.

▪ Survie neuronale

Fonction anti-apoptotique. Les lignées humaines de neurones *PRNP*^{-/-} sont plus sensibles à l'apoptose que les neurones qui expriment PrP^C. L'induction de l'expression de PrP^C par ces cellules inhibe l'apoptose induite par la surexpression de Bax [7]. Ces observations indiquent que PrP^C aurait une fonction anti-apoptotique.

Protection contre le stress oxydant. La région des octarepeat de PrP^C a la capacité de fixer divers ions métalliques, dont le cuivre pour lequel l'affinité est la plus forte. De nombreuses expériences sur cellules dérivées de souris *Prnp*^{-/-} permettent de proposer que PrP^C a un rôle de protection contre le stress oxydant, par une activation de la superoxyde dismutase (SOD) dépendante du cuivre ou peut-être même par une activité intrinsèque de type SOD de la protéine PrP^C [9].

▪ Fonction synaptique

PrP^C est exprimée par les neurones et est principalement localisée au niveau des boutons présynaptiques. De plus, les modifications pathologiques

précoces des maladies à prion impliquent invariablement des désorganisations et des pertes synaptiques, ainsi que des dépôts de PrP^{Sc} au niveau des synapses. Ces constatations permettent de faire l'hypothèse d'une fonction synaptique de PrP^C. Certaines altérations chez les souris déficientes en PrP^C pourraient être liées à une dysfonction synaptique, telle que l'altération des rythmes circadiens, notamment de veille et de sommeil.

▪ Adhérence cellulaire

La laminine est le constituant majeur de la lame basale en dehors du collagène. L'interaction de PrP^C avec la laminine est impliquée dans la différenciation cellulaire dépendante de la laminine et dans l'allongement des neurites [30]. Ce rôle de PrP^C dans l'adhérence cellulaire s'exprime aussi à travers des interactions homophiles PrP^C-PrP^C. Cette interaction permet notamment la régulation de la migration trans-endothéliale au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique [65]. Elle est aussi impliquée au niveau de la synapse immunologique entre lymphocytes T et cellules dendritiques : PrP^C colocalise avec le TCR d'un côté et avec les molécules du CMH-II de l'autre.

▪ Olfaction

PrP^C est exprimée au niveau des axones des neurones récepteurs olfactifs périphériques et des axones de cellules nerveuses centrales telles que les cellules mitrales du bulbe olfactif. Ceci suggère une fonction olfactive pré-synaptique de PrP^C [40]. Une étude fonctionnelle sur des souris transgéniques PrP^{-/-} met en évidence le rôle critique de PrP^C dans le traitement de l'information sensorielle par le système olfactif [41].

Il n'est toujours pas établi avec certitude que les modifications neuropathologiques induites par le prion soient liées à une perte de fonction de PrP^C. Le phénotype très modéré des souris déficientes en PrP^C montre au contraire que cette hypothèse ne suffit pas. Plusieurs auteurs proposent que les mécanismes physiopathologiques des EST soient davantage associés à un gain de fonction toxique de l'isoforme pathologique de la protéine prion : PrP^{Sc}.

2.1.2. Protéine prion pathologique, PrP^{Sc}

1. Propriétés structurales et biochimiques

PrP^{Sc} possède une structure primaire identique à PrP^C mais les deux protéines présentent des propriétés biochimiques et structurales très différentes. PrP^{Sc} se caractérise par sa richesse en feuillets β et sa résistance remarquable aux protéases. Ces propriétés confèrent à PrP^{Sc} une résistance remarquable et rendent donc son élimination délicate. Les principales différences entre PrP^C et PrP^{Sc} sont résumées dans la table 2.

PrP ^C	PrP ^{Sc}
Monomères	Agrégats
Sensible à la protéinase K	Résistance partielle à la protéinase K
Bonne solubilité dans les détergents non ioniques	Solubilité dans les détergents non ioniques faible ou nulle
<u>Structure II (dichroïsme circulaire) :</u> - Hélices : 42% - Feuilletés : 3%	- Hélices : 30% - Feuilletés : 43%
Demi-vie : 3-6h	Demi-vie : > 24h

Table 2 : Comparaison de propriétés de PrP^C et PrP^{Sc}.

2. Conversion PrP^C - PrP^{Sc}

La présence de PrP^C est nécessaire au développement de la maladie. En effet, les souris qui n'expriment pas le gène *prnp* sont résistantes à l'infection par le prion [11]. Par ailleurs, PrP^C et PrP^{Sc} ont des structures primaires, poids et charges très similaires. Prusiner a émis l'hypothèse que PrP^C est le précurseur de PrP^{Sc}. En 1994, Kocisko, et al. sont les premiers à réussir une conversion PrP^C-PrP^{Sc} *in vitro*. Il y aurait donc conversion des hélices α de PrP^C en feuillets β . Ceci induirait un repliement anormal de PrP^{Sc} et expliquerait ainsi sa moindre solubilité, sa résistance partielle à la protéolyse, et sa tendance à l'agrégation par empilement de feuillets.

Le mécanisme d'agrégation (ou d'oligomérisation) de PrP^{Sc} est progressif : la PrP^{Sc} infectieuse, monomère actif, forme d'abord de petits oligomères solubles et se propage en imprimant son empreinte

conformationnelle à PrP^C. Se forment alors des protofilaments qui, devenus fibrilles, formeront des plaques amyloïdes (figure 4).

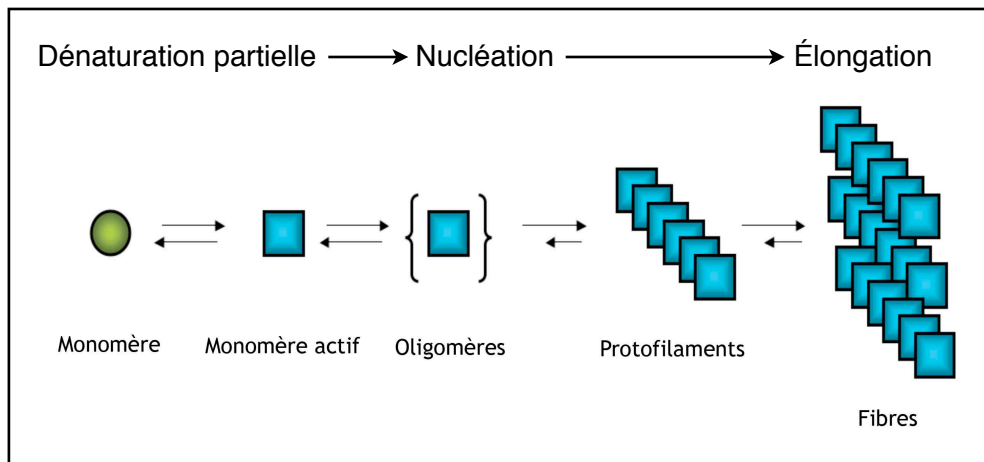


Figure 4 : Modèle d'agrégation de PrP.

Assez récemment, la mise au point de la Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) a permis d'obtenir une grande quantité de PrP^{Sc} à partir de peu de matériel infectieux [56]. La figure 5 présente le principe de cette technique, assimilable à la PCR en biologie moléculaire. De faibles quantités de PrP^{Sc} sont incubées en présence d'un large excès de PrP^C. Il se formerait alors des premiers noyaux de PrP^{Sc} résultant de la transconformation de PrP^C. L'amplification du signal est obtenu en alternant des étapes de sonication destinées à casser ces noyaux, et des étapes d'incubation au cours desquelles a lieu la conversion et l'élongation de la PrP^{Sc}.

Cette technique et d'autres, qui en dérivent et l'améliorent, pourraient permettre d'obtenir rapidement un outil diagnostique pour la détection de faibles quantités de prion à partir d'échantillons biologiques facilement accessibles, ce qui n'est encore pas possible à ce jour, en routine de diagnostic.

En 2007, Deleault, et al. ont identifié les composants minimum requis pour l'amplification de PrP^{Sc} : PrP^C, lipides copurifiés et molécules polyanioniques simple brin. Par PMCA, ils ont généré de l'infectiosité prion à partir d'homogénats de cerveaux de hamsters non malades [16]. Ce résultat peut être considéré comme la preuve finale de l'hypothèse de Prusiner du «tout protéique».

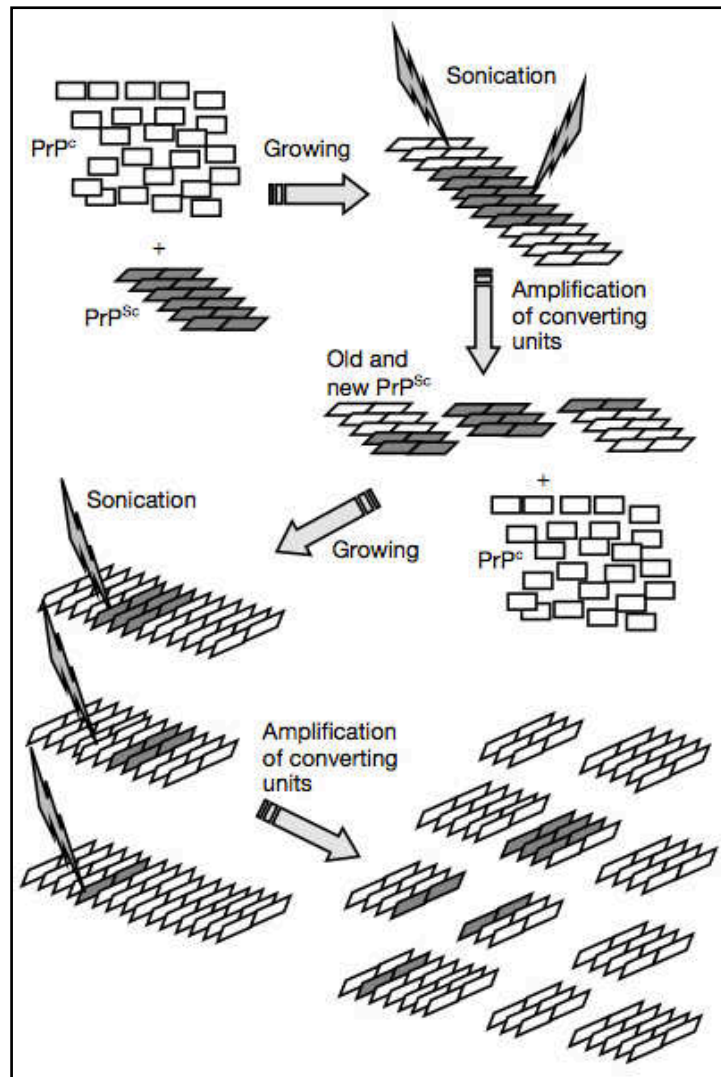


Figure 5 : Représentation schématique de la procédure de PMCA. L'amplification repose sur plusieurs cycles d'incubation de PrP^{Sc} en présence d'un large excès de PrP^C, suivie d'une sonication. Lors de l'incubation, la transconformation de PrP^C en PrP^{Sc} augmente la taille des oligomères de PrP^{Sc}. Pendant la sonication, les agrégats sont disloqués, produisant ainsi une population plus nombreuse d'unités de conversion. D'après [56].

3. Localisation de PrP^{Sc}

Dans le cas du vCJD, transmis par voie orale, on assiste à deux phases précliniques : la lympho-invasion, puis la neuro-invasion. Celles-ci sont permises en raison de l'expression ubiquitaire de PrP^C. Lors de la première phase, PrP^{Sc} s'accumule d'abord dans les organes lymphoïdes secondaires périphériques, à commencer par les plaques de Peyer qui constituent la voie d'entrée digestive principale pour le prion. Elle gagne ensuite les ganglions mésentériques puis l'ensemble du système lymphoréticulaire, notamment les amygdales. Ensuite, lors de la phase de neuroinvasion, l'infectivité est transférée *via* le système nerveux périphérique autonome vers le SNC.

4. Pathogénicité de PrP^{Sc}

L'équipe Transmission et Pathogénèse des Maladies à Prion (UMR CNRS 5163), dans laquelle j'ai effectué mon travail de recherche, a développé une méthode d'oligomérisation de PrP recombinante. Celle-ci permet d'obtenir différentes espèces oligomériques séparées selon leur taille. Les oligomères II sont composés de 8 à 15 sous-unités monomériques de PrP. Ils présentent des caractéristiques biochimiques «Sc-like», telles que la richesse en feuillets β et la résistance partielle à la protéolyse [55]. Les oligomères II de PrP ont un important effet neurocytotoxique, indépendamment de l'expression endogène de PrP par les cellules. A l'inverse, les monomères solubles et les agrégats de plus grande taille n'expriment aucun effet cytotoxique [58].

D'autre part, les oligomères solubles de PrP^{Sc} sont associés à l'infectivité du prion : les particules non fibrillaires de 14 à 28 mers, purifiées à partir du cerveau, sont les particules les plus efficaces pour provoquer les EST *in vivo* [57].

Il est important de connaître les partenaires d'interaction de PrP^{Sc} et notamment des oligomères solubles de PrP^{Sc} pour comprendre les mécanismes pathologiques des maladies à prion.

2.2. C1q et prion

C1q, la protéine de reconnaissance de la voie classique de la cascade du complément, est principalement connue pour ses fonctions sériques de reconnaissance des complexes immuns et d'opsonisation des cellules apoptotiques. Pourtant, C1q assure également des fonctions essentielles dans le SNC. Ainsi, C1q est exprimée transitoirement dans les neurones post-nataux, et permet l'élimination des synapses inutiles pendant le développement. Normalement, son expression est diminuée chez l'adulte. Cependant, dans un modèle murin de glaucome, elle est à nouveau sur-exprimée au niveau des synapses à éliminer [60]. Cela suggère que l'élimination des synapses orchestrée par C1q pourrait être réactivée de façon aberrante au cours des maladies neurodégénératives.

De fait, de nombreuses publications montrent que C1q est impliquée dans la pathogénèse des maladies à prion. Chez les souris déficientes en C1q, le délai d'apparition de la maladie est significativement retardé après

inoculation intrapéritonéale [43]. En effet, d'autres expériences ont montré que C1q participe à la prise en charge précoce de PrP^{Sc} par les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs), via la calréticuline, un récepteur de C1q exprimé par les cDCs. C1q participerait donc à la pathogénèse de la maladie à un stade précoce, en favorisant sa capture intestinale par les cDCs, qui vont ensuite assurer le transit vers les tissus lymphoïdes secondaires, où la PrP^{Sc} s'accumule dans les premiers temps de l'infection [23]. De fait, C1q interagit directement avec la protéine prion.

Notre laboratoire a montré que les petits oligomères de PrP formés *in vitro* se fixent aux têtes globulaires de C1q [20]. C1q stimule l'oligomérisation de PrP de façon dose-dépendante, se complexe aux petits oligomères de PrP et inhibe leur cytotoxicité [21].

Le domaine globulaire carboxy-terminal de C1q (gC1q) est formé d'un hétérotrimère des chaînes peptidiques C1qA, C1qB et C1qC. Il constitue l'unité de base de la reconnaissance des ligands. Des structures trimériques homologues au domaine gC1q sont identifiées dans un grand nombre d'autres

Protéine	Tissu d'origine	Fonction
Adiponectine	Protéine sérique exclusivement sécrétée par les adipocytes	anti-diabétique ; anti-athérogène ; homéostasie énergétique ; anti-inflammatoire, angiogénique
C1q (C1QA, C1QB, C1QC)	Protéine sérique d'origine hépatique	Protéine de reconnaissance de la voie classique du complément ; tolérance immune ; adhésion cellulaire
EMILIN-1	Tissus conjonctifs, vaisseaux sanguins, peau, coeur, poumons, reins, cornée, intestin grêle, aorte, utérus, appendice	Glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire ; support d'adhésion du muscle lisse ; impliquée dans l'adhésion cellulaire dépendante de la β 1-intégrine
Multimérine 1	Plaquettes, cellules endothéliales, poumon, foie	Stockage et stabilisation du facteur V de la coagulation ; adhésion cellulaire
Multimérine 2	Cellules de l'endothélium vasculaire	Angiogénèse ; hémostasie ; adhésion cellulaire
Cbln1	structures post-synaptiques des cellules de Purkinje (cervelet)	Précurseur de la cérébelline (effet corticotrope). Développement, maintien et plasticité des synapses entre cellules granulaires et cellules de Purkinje.
C1QTNF1	Coeur, placenta, foie, muscle squelettique	Ligand du récepteur V2 à l'ADH ; inhibition de l'agrégation plaquettaire par blocage de l'interaction vWF/collagène

Table 3 : Fonctions et profils d'expression de quelques membres de la famille C1q. D'après [28].

protéines. Toutes les protéines qui possèdent un domaine gC1q sont regroupées dans la «famille C1q». Seules certaines d'entre elles sont exprimées sélectivement dans le SNC. Leurs fonctions sont rarement connues précisément, mais celles qui sont décrites impliquent souvent des fonctions de signalisation intercellulaire (table 3).

Nous avons émis l'hypothèse que les oligomères de PrP peuvent interagir avec les têtes globulaires d'autres protéines de cette même famille. Pour les raisons explicitées ci-après, nous nous sommes particulièrement intéressés à Cbln1.

2.3. Cbln1

La sous-famille Cbln appartient à la famille C1q et est composée de quatre membres aux profils d'expression différents : Cbln1, Cbln2, Cbln3 et Cbln4 (figure 6).

Cbln1 est le précurseur de la cérébelline, un hexadécapeptide dont on sait peu de chose. Les pourcentages d'identité et d'homologie de séquence entre le domaine gC1q de la Cbln1 murine et des trois protéines C1q sont

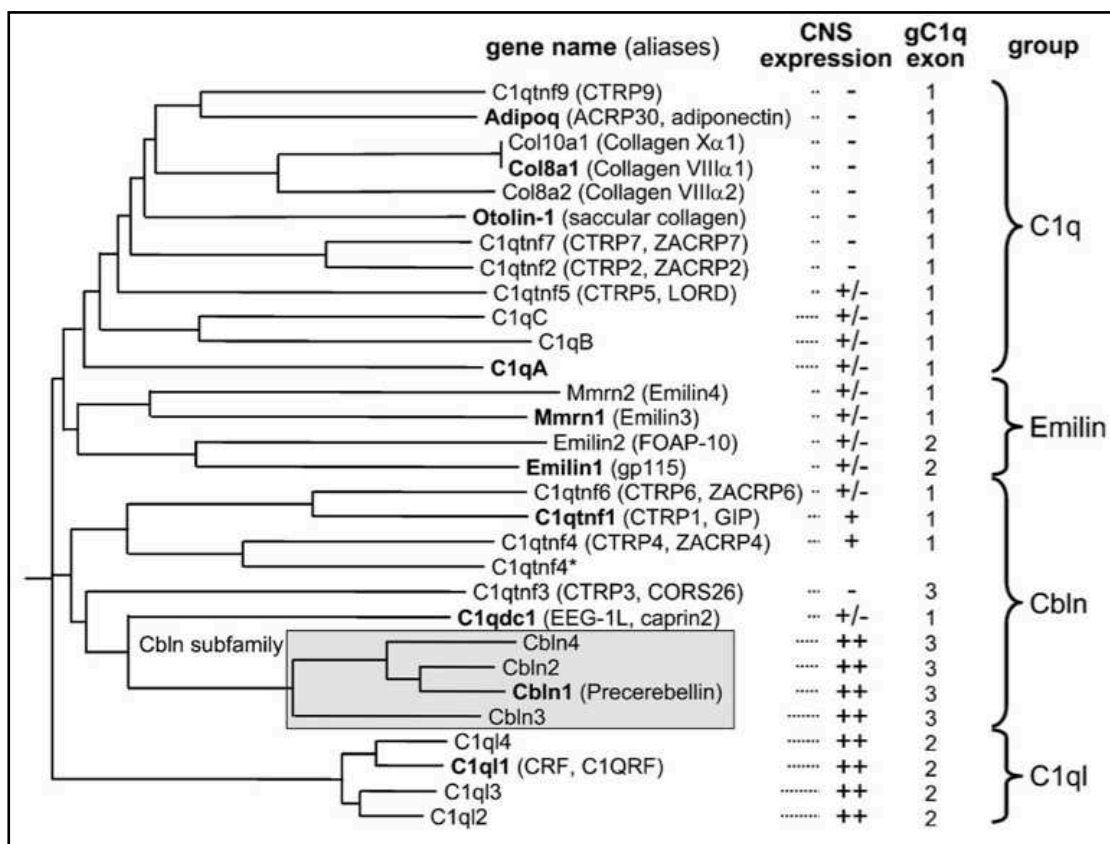


Figure 6 : Dendrogramme phylogénétique de la famille C1q, généré par alignement de séquences de domaines gC1q chez la souris. D'après [68].

évaluées grâce à l’outil d’alignement de séquence BlastP du National Center for Biotechnology Information (NCBI) [3]. Les résultats sont résumés dans la table 4.

Séquences comparées	% d'identité de séquence	% d'homologie de séquence
Cbln1 (62-193) - C1qA (110-245)	27	50
Cbln1 (62-193) - C1qB (117-253)	29	48
Cbln1 (62-193) - C1qC (115-245)	31	49

Table 4 : Comparaison par alignement de séquences (Blastp) des têtes globulaires de Cbln1 et de C1q. Les acides aminés des têtes globulaires sont indiqués entre parenthèses.

L’expression de Cbln1 est diffuse et hétérogène dans le SNC, mais elle est est prédominante dans les cellules granulaires du cervelet, un organe responsable de la coordination des mouvements et de l’équilibre. Cbln1 est sécrétée par les cellules granulaires dans les synapses entre les fibres parallèles (PF, axones des cellules granulaires du cervelet) et les dendrites des cellules de Purkinje (PC) . Ces synapses jouent un rôle clé dans les maladies à prion, au décours desquelles leur dégénérescence est à l’origine de l’ataxie, un des symptômes majeurs [67].

Cbln1 est une glycoprotéine de 35kDa présentant deux sites de N-glycosylation (Asn23 et Asn79) [33]. Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous la forme d’un dimère de deux têtes globulaires gC1q reliées par un pont disulfure amino-terminal (figure 7A). Par mutagenèse dirigée, Bao, et al. ont montré que les deux cystéines conservées dans la séquence des protéines de la sous-famille Cbln (figure 8) ne sont pas nécessaires à la formation de trimères, mais sont indispensables à la dimérisation de ces trimères (figure 7B) [4].

L’étude de souris déficientes pour le gène codant Cbln1 (souris *cbln1*^{-/-}) a permis d’élucider les fonctions de Cbln1 dans le cervelet. Ces souris présentent une ataxie cérébelleuse et des anomalies sévères des synapses PF-PC [33]. Les mêmes phénomènes sont également observés dans les maladies à prion. Tout comme PrP, Cbln1 a un rôle déterminant dans la fonction synaptique. Celle-ci est essentielle à la formation correcte, à la maintenance, et à la plasticité des synapses PF-PC [33]. Cette activité est

médiée par une interaction tripartite : Cbln1 forme un pont entre les neurexines (molécules d'adhésion cellulaire) pré-synaptiques et GluD2, un des récepteurs au glutamate de type δ [63].

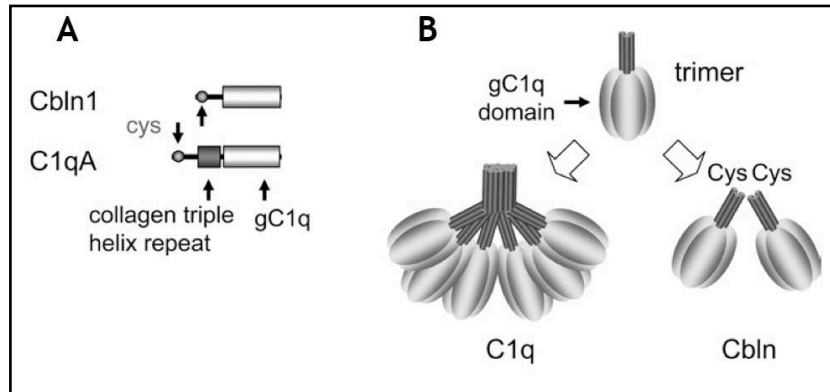


Figure 7 : Structures comparées de Cbln1 et C1q. (A) Représentation schématique des structures de la Cbln1 et de la chaîne A de C1q. (B) Multimérisation des protéines de la famille C1q. Une unité trimérique est formée par le domaine gC1q et forme des complexes multimériques d'ordre supérieur. C1q forme un hexamère de trimères. Cbln1 forme un dimère de trimères.

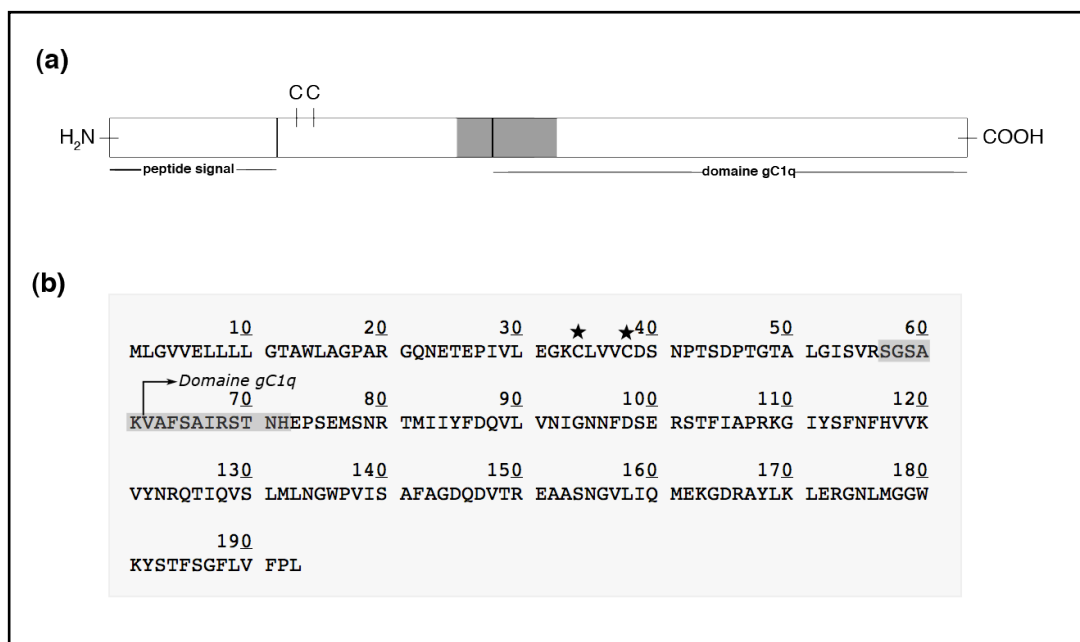


Figure 8 : Structure primaire de Cbln1.

(a) Représentation schématique de la structure primaire de la Cbln1. La localisation du peptide cérébelline est indiquée par une ombre grise. Le domaine globulaire gC1q se situe dans la portion C-terminale. Les deux résidus cystéines indispensables à la formation d'hexamères sont situés juste en aval du peptide signal (b) Séquence en acides aminés de la Cbln1. L'hexadécapéptide cérébelline est en gris, les résidus cystéine conservés sont marqués par une étoile et la flèche représente le début du domaine globulaire gC1q. Les acides aminés 1 à 21 correspondent au peptide signal.

OBJECTIFS DU PROJET

Les mécanismes physiopathologiques des maladies à prion sont mal compris. Deux principales hypothèses sont émises afin d'expliquer l'origine des symptômes. Selon une première hypothèse, ceux-ci pourraient être directement liés à la perte de la fonction de PrP^C qui est recrutée au cours de la maladie pour former de la PrP^{Sc}. Selon la seconde, la maladie serait plutôt la conséquence de la neurotoxicité intrinsèque de PrP^{Sc}.

Le laboratoire a produit et caractérisé les oligomères de PrP recombinante. Ceux-ci représentent un outil de travail précieux car ils miment les propriétés biochimiques de PrP^{Sc}. L'équipe a pu montrer que seuls les oligomères de petite taille, ou oligomères II, sont cytotoxiques, alors que ni les monomères, ni les oligomères de plus grande taille ne le sont. Les oligomères II de PrP sont reconnus par les têtes globulaires de C1q, la protéine de reconnaissance de la voie classique du complément [20]. De plus, C1q inhibe la cytotoxicité des oligomères II mais favorise l'oligomérisation de PrP de manière dose-dépendante [21].

C1q est le chef de file de la famille C1q, dont les membres possèdent tous, dans leur portion C-terminale, des domaines (ou têtes) globulaires gC1q. Ces domaines permettent la formation de trimères et sont responsables des propriétés de reconnaissance de ces protéines [25]. Il est donc fort probable que la PrP puisse interagir avec les têtes globulaires d'autres protéines de cette même famille. Parmi les protéines de la famille C1q, seules quelques unes sont exprimées de manière spécifique dans le SNC, où PrP^{Sc} s'accumule. Parmi elles, notre laboratoire s'est intéressé particulièrement à la sous-famille des protéines Cbln.

Notre intérêt pour Cbln1 est porté par plusieurs arguments :

- le phénotype ataxique des souris Cbln1^{-/-}, qui rappelle les symptômes des maladies à prion
- l'expression de Cbln1 dans le cervelet, siège de la coordination des mouvements et de l'équilibre ;
- son rôle dans la formation, la maintenance et la plasticité des synapses PF-PC, dont la dégénérescence est précoce au cours des maladies à prion ;

- sa proximité structurale avec C1q, qui le rend très bon candidat d'interaction avec les oligomères de PrP.

L'ensemble de ces données fait suspecter une interaction entre Cbln1 et PrP. L'accumulation de PrP^{Sc} pourrait en effet être responsable d'une déplétion en Cbln1 dans le cervelet, ce qui serait à l'origine de l'ataxie observée au cours des EST. Ce travail constitue une première étape dans la confirmation de cette hypothèse. Son objectif est la mise en évidence d'une interaction *in vitro* entre Cbln1 et PrP, avant d'effectuer des études *in vivo*. Mettre en évidence la relevance fonctionnelle de cette interaction pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes des maladies à prion, afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

D'un point de vue pratique, Cbln1 est la protéine la plus étudiée de la sous-famille Cbln. Notre collaboration avec l'équipe japonaise de Michisuke Yusaki nous donne accès à un plasmide codant pour Cbln1.

Dans un premier temps, mon objectif a été de mettre en place et d'adapter au laboratoire le processus de production et de purification de Cbln1 à partir de surnageants de cellules transfectées, puis de caractériser la protéine ainsi produite. Dans un deuxième temps, j'ai cherché à mettre en évidence *in vitro* l'interaction entre Cbln1 et PrP par ELISA et par résonance plasmonique de surface (SPR). Des essais d'oligomérisation de PrP en présence de Cbln1 ont ensuite été analysés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Expression de la Cbln1 recombinante en cellules HEK 293

Construction plasmidique. Un plasmide codant pour l'His-HA-Cbln1 nous a été donné par Michisuke Yuzaki, Université de Keio, Tokyo. Afin de permettre la détection de la protéine, un tag hémagglutinine (HA) (YPYDVPDY) est cloné en 5' de l'ADNc codant pour la Cbln1 murine sauvage. Un tag 6X His est en 5' de ce premier tag HA (His-HA-Cbln1) afin de permettre la purification de la protéine. Cette séquence, schématisée dans la figure 9, est clonée dans le vecteur d'expression pCAGGS, sous le contrôle du promoteur CMV [39].

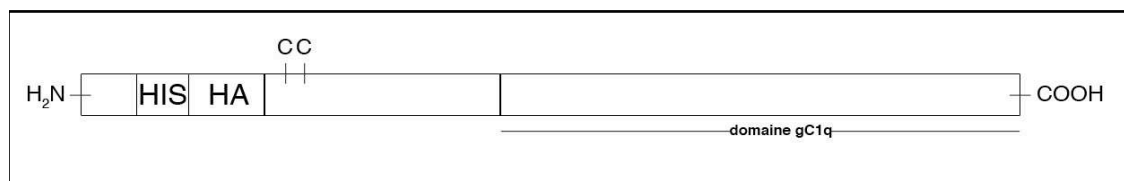


Figure 9: Schématisation de la construction His-HA-Cbln1. D'après [68].

Culture cellulaire. Les cellules HEK 293 (Human Embryonic kidney 293) sont cultivées dans des boîtes de Petri de 10 cm (Nunc) dans le milieu D-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium + Glucose 4500 mg/L + GlutaMax + Pyruvate (Invitrogen) supplémenté avec 10% de SVF et 50 µg/mL de gentamicine) à 37°C, 5% CO₂. Deux fois par semaine, les cellules sont traitées à la trypsine. Un cinquième des cellules est alors remis en culture dans 10 mL de milieu D-10 dans une nouvelle boîte.

Transfection des cellules par coprécipitation au phosphate de calcium. La veille de la transfection, 4.10⁶ cellules sontensemencées et cultivées 24 heures dans 10 mL de milieu D-10, dans une boîte de Petri de 10 cm (Nunc). Les cellules sont transfectées quand elles sont à 60-80% de confluence, ce qui correspond à la phase exponentielle de leur croissance cellulaire pendant laquelle elles sont en mitose. La transfection est réalisée à température ambiante. Dix microgrammes de plasmides dilués dans un volume final de 250 µL d'eau sont complexés avec 250 µL de CaCl₂ 0.5 M puis avec 500 µL de tampon HBSS 2X (HEPES 50 mM pH 7,07, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Il est ensuite ajouté goutte à goutte à la culture cellulaire, puis les boîtes de Petri sont délicatement mélangées. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 12 à 16 heures. Ensuite, elles sont rincées avec précautions en PBS, afin d'éliminer les protéines contaminantes, notamment l'albumine. Le milieu D-10 est enfin

remplacé par 3 mL de milieu synthétique CD293 (Invitrogen), qui est collecté 48 heures plus tard et stocké à +4°C avec un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete EDTA-free, Roche).

2. Purification et concentration de Cbln1 recombinante

L'His-HA-Cbln1 a été purifiée en utilisant une colonne de chromatographie d'affinité métal au Cobalt (TALON, Clontech). 100 mL de surnageant de transfection His-HA-Cbln1 sont concentrés environ 50 fois par ultrafiltration sur un filtre Amicon Ultra 10K MWCO puis éventuellement dialysée en tampon d'équilibration (phosphate de sodium 50 mM pH 7,0, NaCl 300 mM). Le solution est alors incubée pendant la nuit, sous agitation à +4°C, avec 500 μ L de résine au cobalt pré-équilibrée avec le tampon d'équilibration. Après deux lavages dans cette même solution, la résine est transférée dans une colonne de chromatographie et la protéine est éluée dans un tampon 150 mM imidazole/50 mM phosphate de sodium/300 mM NaCl, par fractions de 500 μ L. L'éluion de la protéine est suivie par spectrophotométrie UV à 280 nm.

Les fractions contenant la protéine sont ensuite dessalées sur colonne Sephadex G-25M PD-10 (GE Healthcare) afin d'éliminer l'imidazole. L'éluion est effectuée en tampon HEPES 10 mM pH 7,4 et est collectée par fractions de 1 mL. L'éluion de la protéine est suivie par spectrophotométrie UV à 280 nm. Les fractions les plus concentrées issues de la purification puis du dessalage d'His-HA-Cbln1 sont enfin poolées et concentrées par ultrafiltration sur un filtre Amicon Ultra 10K MWCO.

La quantité d'His-HA-Cbln1 purifiée est estimée par spectrophotométrie UV. Le coefficient d'absorption molaire de l'His-HA-Cbln1 à 280 nm est calculé à partir de sa séquence, selon la formule suivante : $\epsilon = 5500 W + 1490 Y + 125 C-C$, où W est le nombre de résidus tryptophane, Y, le nombre de résidus tyrosine, et C-C le nombre de cystines [48].

$$\epsilon_{280nm} = 28\ 545\ M^{-1}cm^{-1}.$$

3. Électrophorèse des protéines

Condition non réductrice. L'His-HA-Cbln1 est diluée volume à volume dans un tampon Tris 200 mM pH 6,8, SDS 2%, Glycérol 10%. 1/10^{ème} de volume de

solution de bleu de bromophénol (bleu de bromophénol 0,05%, Glycérol 10%) est ajouté avant le dépôt sur gel.

Condition réductrice. La réduction des ponts disulfure peut être partielle ou totale. La réduction partielle est effectuée en diluant directement l'His-HA-Cbln1 purifiée dans du tampon Laemmli 5X (Tris HCl 625 mM, pH 6,8, SDS 10%, Glycérol 50%, bleu de bromophénol 1mg/ml, β -Mercaptoéthanol 12,5%). Pour une réduction totale, les échantillons sont dilués volume à volume dans un tampon Tris 0,2M pH8, SDS 2%, Urée 8M, dithiothréitol (DTT) 100 mM puis incubés 5 minutes à 99°C. Les protéines ainsi réduites sont ensuite alkylées en incubant les échantillons 30 minutes à 37°C dans un volume de tampon Tris 0,2M pH8, SDS 2%, Urée 8M, iodoacétamide 400mM. L'alkylation empêche la formation de nouveaux ponts disulfures. Enfin, 1,5/10^{ème} de volume de solution de bleu de bromophénol (bleu de bromophénol 0,05%, Glycérol 10%) est ajouté avant le dépôt sur gel.

Migration. Les échantillons ainsi préparés sont séparés par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) sur un gel en gradient 4-12% (#NXG41212, RunBlue). La révélation des protéines est ensuite effectuée par coloration au bleu de Coomassie ou par Western-Blot.

Coloration au bleu de Coomassie. Les gels sont fixés pendant 10 minutes dans une solution isopropanol 25%, acide acétique 10%. Ils sont ensuite colorés toute la nuit dans une solution de bleu de Coomassie (PageBlue, Fermentas Life Sciences) puis décolorés à l'eau avant d'être numérisés.

Western-Blot. Les gels sont électro-transférés en milieu liquide, dans du tampon Towbin (Tris 25 mM , glycine 192 mM, éthanol 20%) sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0.2 μ m, Bio-Rad) pendant 1 heure à +4°C, sous 350 mA. La membrane est saturée dans une solution de PBS-Tween 0,1%-BSA puis lavée trois fois cinq minutes en PBS-Tween 0,1%. Elle est ensuite incubée dans l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation pendant une nuit à +4°C, puis lavée quatre fois cinq minutes en PBS-Tween 0,1%. La membrane est alors incubée dans l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation pendant une heure à température ambiante, puis lavée quatre fois dix minutes en PBS-Tween 0,1%

puis cinq minutes en PBS. Enfin, les membranes sont développées par ECL (Enhanced ChemiLuminescence, UptiLight, Interchim) et exposées sur des films autoradiographiques (ClearBlue X-Ray Film, ThermoScientific).

Les anticorps suivants sont utilisés :

- primaire : anticorps monoclonal IgG de Rat anti-HA (3F10, Roche) au 1/10000^e
- secondaire : anticorps monoclonal anti-IgG de Rat couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, 112-035-062). au 1/10000^e.

Immunodot. Les échantillons sont dilués en PBS. Cinquante microlitres de chaque dilution sont déposés sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot Transfer Medium, 0.2 µm, Bio-Rad) à l'aide d'un appareil Bio-Dot (Bio-Rad). La saturation et la révélation de la membranes sont décrits dans la rubrique *Western-Blot*.

4. Expression et Purification de PrP recombinante

La procédure complète est décrite en détail dans l'article de Dumestre-Pérard, et al. [20] Des bactéries *Escherichia coli* (BLB21) sont transformées avec un plasmide codant pour la PrP et cultivées dans 2 L de milieu. Après centrifugation, les bactéries sont lysées à la presse de French (ThermoSpectronic) à 16 000 psi et centrifugés à nouveau. Le culot contenant les corps d'inclusion est ensuite lavé avec du Triton X-100 1% puis avec un tampon de lyse contenant 5 mM de phénylméthylsulfonylfluorure (PMSF) 5 mM et 500 mM de NaCl. Enfin, le culot est resuspendu dans 25 mL d'une solution MOPS 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 0,625 mM, guanidine-HCl 5 M, PMSF 5 mM, à +4°C pendant 2 heures. Après centrifugation, le surnageant est purifié par chromatographie d'affinité métal sur une colonne 6-FastFlow de Sépharose au Nickel (GE Healthcare). La PrP, fortement liée à la colonne de Nickel est ensuite éluée par fractions d'1 mL par une solution d'imidazole 1 M. Les fractions contenant la protéine sont ensuite dessalées en acétate de sodium 20 mM pH 3,5 avec des colonnes Sephadex (PD-10, GE Healthcare) et concentrées par ultrafiltration sur un filtre Amicon Ultra 10K MWCO.

L'intégrité de la PrP purifiée est ensuite vérifiée en SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide à 10% et sa concentration est déterminée par l'absorbance à 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}} = 62\ 400\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5. Oligomérisation de PrP et chromatographie d'exclusion de taille

La procédure complète a été décrite précédemment [21]. Des monomères de PrP recombinante (5 mg/mL final, en acétate de sodium 20 mM pH 3) sont incubés dans une solution NaCl 100 mM, à 40°C, pendant 18 h. Les β -oligomères sont ensuite séparés par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) sur une colonne de chromatographie liquide haute performance (TSKgel G400SW, Tosoh Bioscience), à l'aide d'un appareillage HPLC Beckman. La chaîne est sous un flux continu d'une solution acétate de sodium 50 mM pH 3,5 et NaCl 50 mM, à un débit de 0,5 mL/min. L'éluat est collecté par fractions de 500 μ L. L'observation des pics d'élution s'effectue par détection dans l'UV à 280 nm et les courbes sont analysées avec le logiciel 32 Karat.

Afin d'étudier l'influence de Cbln1 sur l'oligomérisation de PrP, la PrP monomérique (4,5 mg/mL, soit 200 μ M final) est incubée 18 h à 40°C en NaCl 100 mM, en présence d'His-HA-Cbln1 purifiée à une concentration finale de 0,7 μ M. La solution est analysée en HPLC dans les mêmes conditions que ci-dessus. La présence de Cbln1 dans les fractions d'HPLC est contrôlée par immunodot dans les conditions décrites ci-dessus. Les films sont scannés, puis analysés avec le logiciel ImageJ afin de quantifier le pourcentage de Cbln1 présent dans chaque fraction.

6. ELISA

Avec immobilisation de PrP. Des plaques immunologiques 96 puits (Maxisorp, Nunc) sont coatées avec 100 μ L de PrP recombinante à 10 μ g/mL en tampon $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, à température ambiante sur la nuit, puis lavées 3 fois en PBS-Tween 0,05% (PT). La plaque est saturée en PBS-Sérum Albumine Bovine (SAB) 1% (m/v), en chambre humide à 37°C pendant 1 h, puis lavée 4 fois en PT. Cent microlitres de différentes dilutions d'His-HA-Cbln1 sont ensuite déposés dans les puits : la solution mère d'His-HA-Cbln1 de 145 μ g/mL est diluée au 1:25, 1:50, 1:100 et 1:200. La plaque est alors incubée 2 heures à 37°C, en chambre humide, puis lavée 4 fois en PT. Pour détecter l'His-HA-Cbln1 fixée à la PrP immobilisée, 100 μ L d'anticorps monoclonal anti-HA (3F10, Roche) au 1:1000 en PT sont incubés dans les puits en chambre humide, pendant 1 heure à 37°C. La plaque est ensuite lavée 4 fois en PT. 100 μ L d'anticorps anti-IgG de rat couplé à la peroxydase (HRP) (Jackson

ImmunoResearch, 112-035-062) au 1:10000 en PT sont ensuite déposés dans les puits et incubés en chambre humide, pendant 1 heure à 37°C. La plaque est alors lavée 4 fois en PT. La réactivité est révélée avec 100 µL de tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée avec 50 µL de H₂SO₄ 1 N, puis la plaque est lue par spectrophotométrie à 450 nm sur un lecteur de plaques automatique (Bio-Tek instruments).

Avec immobilisation d'His-HA-Cbln1. Le principe reste le même. Le coating est réalisé avec 100 µL d'His-HA-Cbln1 purifiée à 5 µg/mL, à +4°C sur la nuit. La plaque est saturée en PBS-lait écrémé 5% (m/v), à température ambiante pendant 1 h. Les essais de fixation sont réalisés avec des monomères ou des oligomères II solubles de PrP, à des concentrations allant de 0 à 10 µg/mL. La PrP fixée sur la plaque est ensuite révélée avec le 4F2, un anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 79-92 de la PrP (produit par J. Grassi), dilué au 1:500 en PBS-Tween 0,05%-lait écrémé 5% (PTM). Cet anticorps primaire est incubé pendant 2 heures à température ambiante. La plaque est ensuite incubée avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à l'HRP (Sigma, A 3673) au 1:5000 en PTM, pendant 1 h à température ambiante. La réactivité est révélée avec 100 µL de tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée avec 50 µL de H₂SO₄ 1 N, puis la plaque est lue par spectrophotométrie à 450 nm sur un lecteur de plaques automatique (Bio-Tek instruments).

7. Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Les électrons libres d'une fine couche de métal entrent en résonance avec un faisceau lumineux monochromatique incident. Une partie infime de la lumière est alors réfractée sous la forme d'une «onde évanescente», le reste est réfléchi. Le faisceau réfléchi présente alors une chute d'intensité à un angle défini, appelé angle de résonance. Cet angle varie avec l'indice de réfraction du milieu, qui est lui-même modifié par des changements de masse à la surface de la couche de métal (figure 10A).

Basée sur ce principe, la technologie SPR permet d'observer en temps réel des interactions entre molécules non marquées.

Pour cela, une molécule «appât» est immobilisée de manière covalente à la surface d'une puce de détection (dite «sensor chip»). Une autre molécule,

dite analyte «proie», est injectée en solution tamponnée sur la couche «appât» grâce à un système microfluidique. Lorsque la proie se fixe à l'appât, l'appareil détecte la modification de l'angle de résonance et convertit cette information en signal SPR, exprimé en unités de réponses (RU). La variation du signal est suivie en temps réel sous forme d'un sensorgramme (figure 10B). L'injection de solution tamponnée dépourvue du ligand permet d'observer la dissociation de l'appât et de son ligand. Enfin, la puce est régénérée par différents moyens, afin d'éliminer toute trace du ligand, sans abimer la fixation de l'appât sur la puce.

La technologie SPR permet donc d'obtenir les constantes d'association et de dissociation de l'interaction et donc, de calculer sa constante d'équilibre.

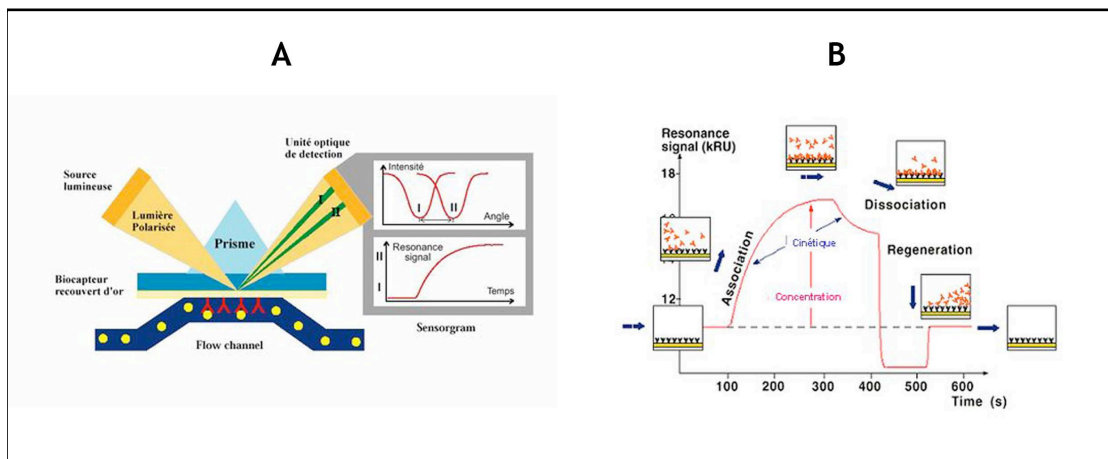


Figure 10 : Résonance Plasmonique de Surface. (A) Principe de détection du signal SPR. (B) Sensorgramme : phases d'association et de dissociation

Pour notre étude, une puce de détection CM4 (BiaCore) est activée avec 50 μL de mélange extemporané EDC/NHS (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide-HCl et N-hydroxysuccinimide) à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ sur un appareil BiaCore X ou BiaCore 3000. Pour l'immobilisation, 20 à 40 μL de deux préparations indépendantes de PrP (diluée à 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acétate de sodium 20 mM pH 3,5) sont injectés sur une des pistes de la puce. Chacune de ces protéines est immobilisée sur la puce de façon à atteindre de 900 à 1200 RU sur chaque piste. Les groupements carboxyles encore actifs de la surface sont désactivés avec de l'éthanolamine 1 M pH 8,5. Comme témoin négatif, une autre piste est simplement activée puis désactivée dans les mêmes conditions. Les essais d'interaction sont ensuite effectués à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ en tampon de course HBS-P (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, surfactant P20 0,05%, pH 7,4). L'His-HA-Cbln1 est injectée sur les protéines immobilisées à

concentrations décroissantes dans ce tampon (50, 25, 10 et 5 nM), en présence de 5 μ M de CuSO_4 . La fixation de la protéine injectée sur la piste contrôle constitue le contrôle négatif d'interactions non spécifiques. Elle est automatiquement déduite de la courbe de fixation sur la PrP immobilisée. Entre chaque essai, la puce est régénérée avec du NaCl 2 M. Les courbes sont analysées à l'aide du logiciel BiaEvaluation 3.2 (BiaCore).

RÉSULTATS

1. Production et caractérisation de l'His-HA-Cbln1

L'efficacité de transfection des cellules HEK 293 par coprécipitation au phosphate de calcium est évaluée à 80-90% en transfectant un plasmide codant un gène rapporteur, la Green Fluorescent Protein (GFP). La fluorescence des cellules est observée 48 heures après la transfection.

La construction plasmidique codant pour Cbln1 fusionnée à un tag HA (Hémagglutinine) et un tag 6X-His est transfectée dans les cellules HEK 293. Cbln1 est une protéine sécrétée dans le milieu extra-cellulaire [36]. Afin de purifier cette protéine, nous avons donc collecté les surnageants de plusieurs séries indépendantes de 10 transfections. La présence d'His-HA-Cbln1 dans chaque surnageant est contrôlée par immunodot anti-HA.

La purification de l'His-HA-Cbln1 par chromatographie d'affinité métal sur résine au cobalt a nécessité une certaine mise au point. Le protocole suivant les recommandations du fabricant ne permet pas une extraction suffisamment efficace de la protéine à partir du surnageant. En effet, les immunodots témoignent de la présence de la protéine en quantité considérable dans les flow-through. Nous avons pu améliorer le rendement de la purification en modifiant la procédure à deux niveaux. Tout d'abord, les surnageants sont considérablement concentrés sur filtre 10K MWCO avant la purification sur la résine. En effet, la diminution du volume de surnageant permet de favoriser le contact la résine et la protéine. Ensuite, l'étape de fixation de la protéine sur les billes de résine a été effectuée pendant une nuit à +4°C au lieu 20 minutes à température ambiante, comme le recommande le fabricant. L'His-HA-Cbln1 retenue sur les billes est ensuite éluée en tampon imidazole puis dessalée sur colonne d'exclusion afin d'éliminer celui-ci. Enfin, l'éluat est à nouveau concentré sur filtre 10K MWCO. A chaque étape de la préparation, un aliquot est prélevé afin de contrôler par immunodot la présence ou l'absence d'His-HA-Cbln1.

Bao, et al. ont montré que Cbln1 est une protéine de 35 kDa, sécrétée dans le milieu extracellulaire principalement sous la forme d'un hexamère. Celui-ci est constitué de deux trimères formant les têtes globulaires gC1q, reliées par un pont disulfure N-terminal. Une coupure enzymatique du domaine N-terminal qui sépare les deux trimères est observée *in vivo* et *in cellulo*. Toutefois, en conditions dénaturantes d'électrophorèse avec SDS, les trimères

se dissocient en dimères et/ou monomères [4]. Afin de confirmer la structure de la protéine produite, la protéine purifiée sous forme réduite et non réduite est déposée sur un gel SDS-PAGE en gradient 4-12% de polyacrylamide. La figure 11 montre la révélation de ces gels par coloration au bleu de Coomassie (figure 11A) et par Western-Blot (figure 11B). La coloration au bleu de Coomassie permet de mettre en évidence toutes les protéines en solution, dont les protéines contaminantes. La BSA est le contaminant majoritaire en culture cellulaire. Le surnageant non purifié non réduit présente une bande majoritaire à environ 60 kDa, qui correspond à l'albumine. Cbln1 n'est pas détectée (A3). Le surnageant purifié non réduit présente deux bandes à environ 70 kDa et 210 kDa, ce qui correspond respectivement au dimère et à l'hexamère de Cbln1 (A1). Le surnageant purifié et partiellement réduit présente trois bandes à environ 35 kDa, 70 kDa et 170 kDa, ce qui correspond respectivement au monomère, au dimère et à un dimère de dimères de Cbln1 (A2). L'albumine n'est pas détectée dans ces deux échantillons. L'étape de

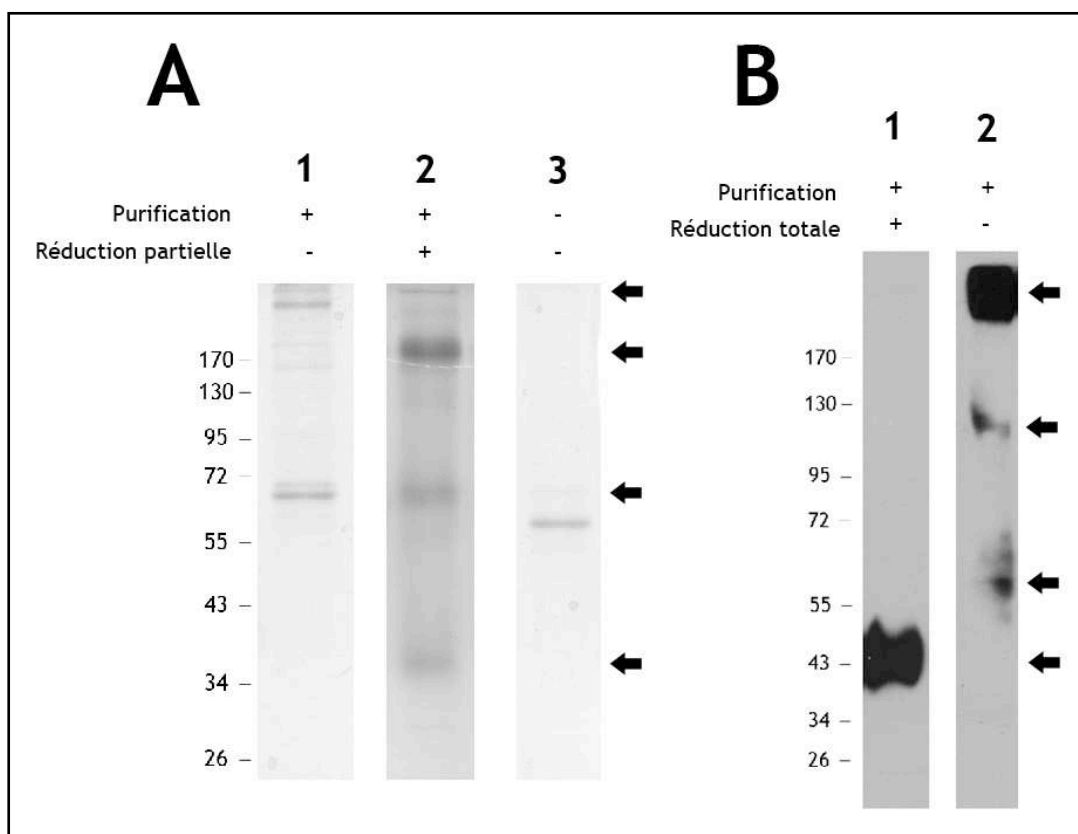


Figure 11 : Électrophorèse des protéines. (A) Coloration au bleu de Coomassie d'un gel SDS-PAGE en gradient 4-12% : 1, His-HA-Cbln1 purifiée non réduite; 2, His-HA-Cbln1 purifiée partiellement réduite au β -mercaptoéthanol; 3, surnageant de transfection d'His-HA-Cbln1 non purifié, non réduit. (B) Western-Blot anti-HA d'un gel SDS-PAGE 10% : 1, His-HA-Cbln1 purifiée réduite totalement au dithiothréitol puis alkylée au iodoacétamide; 2, His-HA-Cbln1 purifiée, non réduite. Les flèches indiquent le monomère, le dimère, le dimère de dimères et le dimère de trimères de Cbln1.

purification a donc permis de l'éliminer. Le Western-Blot confirme la spécificité des bandes observées dans le gel coloré au bleu de Coomassie. Le surnageant purifié non réduit présente principalement un signal à environ 210 kDa qui correspond à la structure hexamérique. Une bande immunoréactive mineure d'environ 110 kDa est en accord avec l'observation de Bao, et al. d'un trimère de Cbln1 (B2). La protéine purifiée, réduite et alkylée (pour empêcher la reformation des ponts disulfures) présente un seul signal à environ 40 kDa qui correspond au monomère de Cbln1.

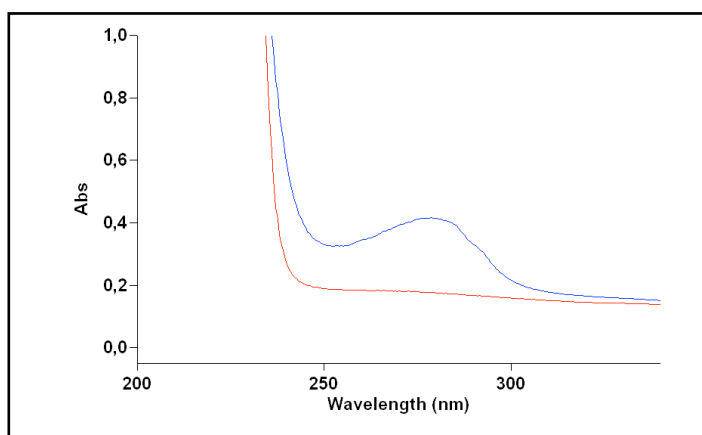


Figure 12 : Spectre UV de l'His-HA-Cbln1 purifiée (bleu), en regard du spectre UV du tampon HEPES 10 mM dans laquelle est préparée la protéine (rouge).

La figure 12 montre le spectre d'absorption dans l'UV de l'His-HA-Cbln1 purifiée. Un unique pic est observable à 280 nm, ce qui évoque l'absence d'imidazole dans la solution d'His-HA-Cbln1. L'absence d'imidazole et l'absence d'albumine, objectivée par la coloration au bleu de Coomassie

permettent de quantifier l'His-HA-Cbln1 à l'aide de son coefficient d'absorption molaire.

Les améliorations de la méthode de production d'His-HA-Cbln1 ont permis d'obtenir jusqu'à 500 µg d'His-HA-Cbln1 purifiée à partir de 30 mL de surnageants de culture CD 293. La protéine a le poids moléculaire attendu, se présente bien sous sa forme native hexamérique. Nous pouvons donc supposer fortement qu'elle pourra interagir avec ses partenaires.

2. L'His-HA-Cbln1 interagit avec la PrP immobilisée

Blanquet-Grossard, et al. ont montré que PrP subit des modifications conformationnelles lors de son immobilisation sur un support solide. Cette transformation serait similaire à la conversion PrP^C - PrP^{Sc}, et serait nécessaire à l'interaction C1q/PrP [6, 20]. Dans cet esprit, et afin d'évaluer l'interaction

entre Cbln1 et PrP, j'ai tout d'abord réalisé des ELISA où PrP a été immobilisée sur la plaque à 10 µg/mL.

L'His-HA-Cbln1 purifiée à 145 µg/mL est ajoutée à différentes dilutions : 1/25^{ème}, 1/50^{ème}, 1/100^{ème} et 1/200^{ème}. La fixation de l'His-HA-Cbln1 est amplifiée par un anticorps anti-HA et révélée avec un anticorps secondaire anti-IgG de rat, couplé à la peroxydase. La figure 13a montre que l'His-HA-Cbln1 fixe PrP de façon dose-dépendante. Le témoin négatif de cet ELISA est un surnageant de cellules non transfectées concentré sur filtre Ultra 10K MWCO. Celui-ci ne fixe pas la PrP immobilisée. Ces résultats suggèrent que Cbln1 fixe spécifiquement PrP lorsque celle-ci est immobilisée sur une plaque.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons effectué des essais de SPR. La PrP recombinante est immobilisée sur une puce CM4 (BiaCore) puis l'His-HA-Cbln1 purifiée est injectée sur la PrP immobilisée à concentrations décroissantes (50, 25, 10 et 5 nM). La figure 13b montre les courbes

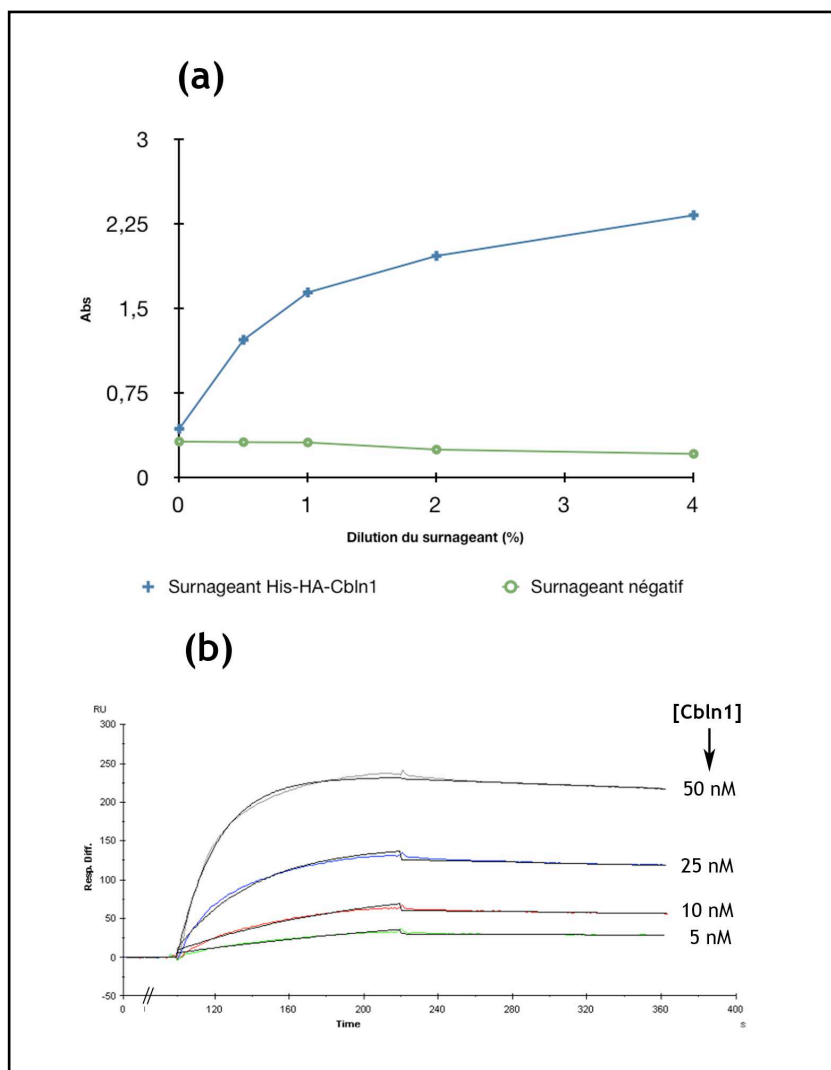


Figure 13 :

Etude de la fixation de Cbln1 sur PrP immobilisée par SPR et ELISA.

(a) Étude de la fixation de l'His-HA-Cbln1 sur la PrP immobilisée par ELISA.

(b) Étude de la fixation de l'His-HA-Cbln1 sur la PrP immobilisée par SPR.

d'association/dissociation de l'His-HA-Cbln1 sur PrP. Cet essai confirme l'interaction dose-dépendante de l'His-HA-Cbln1 avec la PrP immobilisée. Tandis que l'association paraît rapide, la dissociation est plus lente.

Cela suggère une interaction forte entre les deux protéines. Les cinétiques d'absorption et de dissociation des deux protéines présentent deux phases distinctes, ce qui suggère un mécanisme d'avidité. Par conséquent, les cinétiques observées s'accordent difficilement aux modèles mathématiques classiquement utilisés pour interpréter les courbes de SPR, tel que le modèle d'absorption de Langmuir. Ainsi, il ne nous a pas été possible de calculer la constante d'équilibre de l'interaction PrP/Cbln1.

Au total, ces résultats d'ELISA et de SPR suggèrent que l'His-HA-Cbln1 interagit de manière spécifique et dose-dépendante avec la PrP recombinante immobilisée sur un support solide.

3. Les oligomères II de PrP interagissent avec l'His-HA-Cbln1 immobilisée

Une transconformation «PrP^{Sc}-like» de la PrP recombinante peut être réalisée sous différentes conditions de sels, d'agents chaotropiques ou de température. Elle permet l'agrégation des monomères de PrP en différents types d'oligomères «Sc-like», qui se distinguent par leur taille. Notre laboratoire a mis en place une procédure d'oligomérisation de PrP, incubé pendant 18h à 40°C en présence de 100 mM de NaCl. Lorsque l'oligomérisation est réalisée à pH 3,5, la séparation par SEC met en évidence deux espèces oligomériques différentes (oligomères I et oligomères II) et est nécessaire à l'étude différentielle de celles-ci. Ici, nous évaluons l'oligomérisation de PrP sous des conditions très similaires, mais à pH 3. La séparation par chromatographie d'exclusion de taille montre que cette méthode permet d'obtenir presque exclusivement des oligomères II solubles de PrP (figure 14). Ces derniers sont donc utilisables directement, sans étape de séparation.

Nous avons montré que C1q interagit préférentiellement avec les oligomères II solubles de PrP, composés de 8 à 15 sous-unités monomériques de PrP. C1q ne réagit pas avec les monomères solubles de PrP [20, 21]. Ces résultats sont particulièrement intéressants, en regard de la pathogénicité de

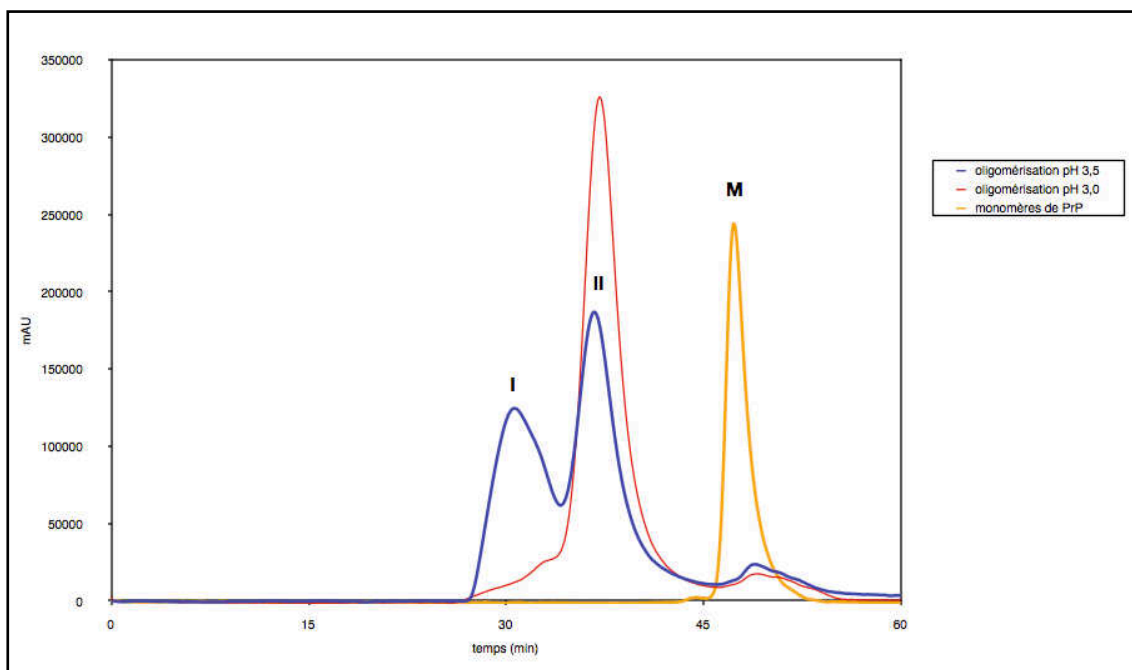


Figure 14 : Analyse comparée par chromatographie d'exclusion des monomères de PrP et des produits d'agrégation de PrP après 18 heures d'incubation à 40°C, en présence de NaCl 100 mM à pH 3,5 et pH 3,0. I, Oligomères I ; II, Oligomères II ; M, Monomères.

PrP^{Sc}, liée aux petits oligomères, et non aux monomères, ni aux agrégats d'ordre supérieur. Au vu des résultats obtenus avec Cbln1 en ELISA et SPR, il est intéressant de savoir, si comme C1q, Cbln1 interagit spécifiquement avec les oligomères solubles de PrP.

Dans un premier temps, afin de montrer la fixation des oligomères II solubles de PrP sur la Cbln1, j'ai réalisé des ELISA où l'His-HA-Cbln1 est immobilisée sur la plaque à différentes concentrations de 0 à 10 µg/mL. Les monomères et les oligomères II solubles sont ensuite déposés dans les puits à 2 µg/mL. Comme le montre la figure 15a, les monomères de PrP ne fixe pas l'His-HA-Cbln1 dans toute cette gamme de concentration. D'autre part, la fixation des oligomères II solubles de PrP sur l'His-HA-Cbln1 augmente avec la concentration d'His-HA-Cbln1 utilisée pour l'immobilisation sur la plaque. A partir de 5 µg/mL, la fixation semble atteindre un plateau qui suggère la saturation du phénomène de fixation.

Dans un deuxième temps, la concentration d'His-HA-Cbln1 immobilisée sur la plaque est fixée à 5 µg/mL. Les essais de fixation sont alors effectués avec des monomères ou des oligomères II solubles de PrP à des concentrations variant de 0 à 5 µg/mL. La figure 15b permet de confirmer que la PrP soluble monomérique ne fixe pas l'His-HA-Cbln1 dans toute cette

gamme de concentration. En revanche, les oligomères II solubles de PrP fixent l'His-HA-Cbn1 de manière dose-dépendante.

L'ensemble de ces résultats montre l'interaction spécifique de l'His-HA-Cbn1 avec les oligomères II de PrP en milieu solide. Nous avons donc voulu mettre en évidence cette interaction en solution.

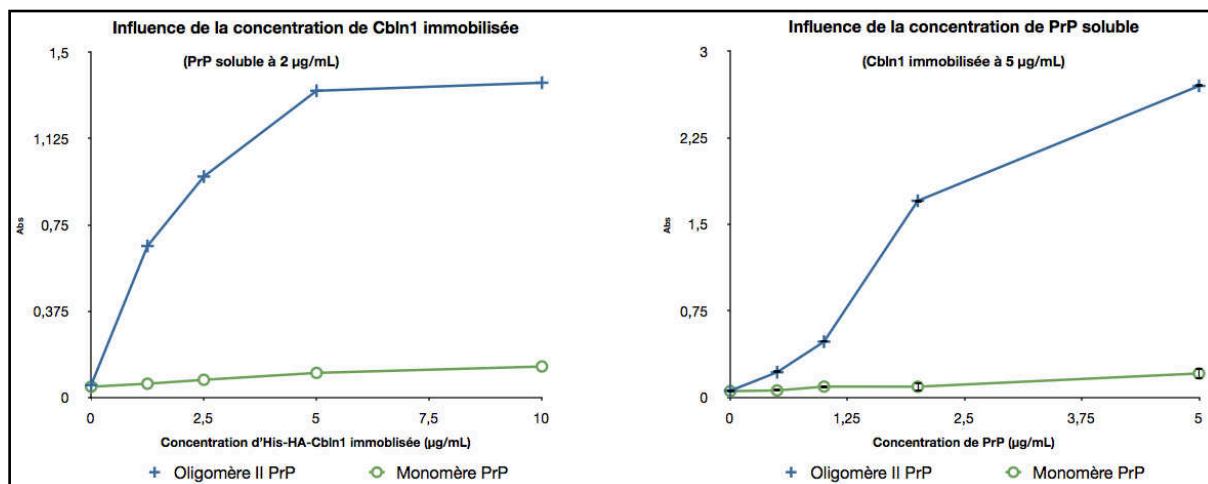


Figure 15 : Etude de la fixation des oligomères II de PrP sur l'His-HA-Cbn1 immobilisée par ELISA. (a) Concentrations croissantes d'His-HA-Cbn1 immobilisée sur a plaque ELISA (de 0 à 10 µg/mL). Le monomère ou l'oligomère II de PrP est ajouté à 2 µg/mL. Cette figure est représentative de plusieurs essais indépendants. (b) L'His-HA-Cbn1 est immobilisée sur une plaque 96 puits à 5 µg/mL. Le monomère ou les oligomères II de PrP sont ajoutés à des concentrations croissantes de 0 à 5 µg/mL. Les barres d'erreur représentent trois écarts-types au dessus et en dessous de la moyenne d'une analyse réalisée en triplicat.

4. Cbn1 influence l'oligomérisation de PrP

L'oligomérisation de PrP recombinante a été réalisée en présence ou non d'His-HA-Cbn1 afin d'analyser l'influence de celle-ci sur l'agrégation de PrP. Les monomères de PrP recombinante (200 µM final) sont incubés dans un tampon acétate de sodium pH 3, en présence de 100 mM de NaCl, pendant 18 heures à 40°C, avec ou sans His-HA-Cbn1 (0,7 µM final). La figure 16 montre les profils de séparation par chromatographie d'exclusion des différentes espèces présentes après une incubation de 18 heures à 40°C. En l'absence de NaCl, les monomères de PrP ne s'agrègent pas et sont tous élués autour de la 48^{ème} minute d'éluion. En revanche, lorsque PrP est incubée en présence de NaCl 100 mM à pH 3, elle s'agrège en oligomères solubles de type II (12 sous-unités de PrP). Le profil de séparation de ce mélange montre une diminution drastique du pic de monomères, et l'apparition d'un pic de β-oligomères II, élué autour de la 36^{ème} minute. Le profil d'éluion du mélange His-HA-Cbn1/

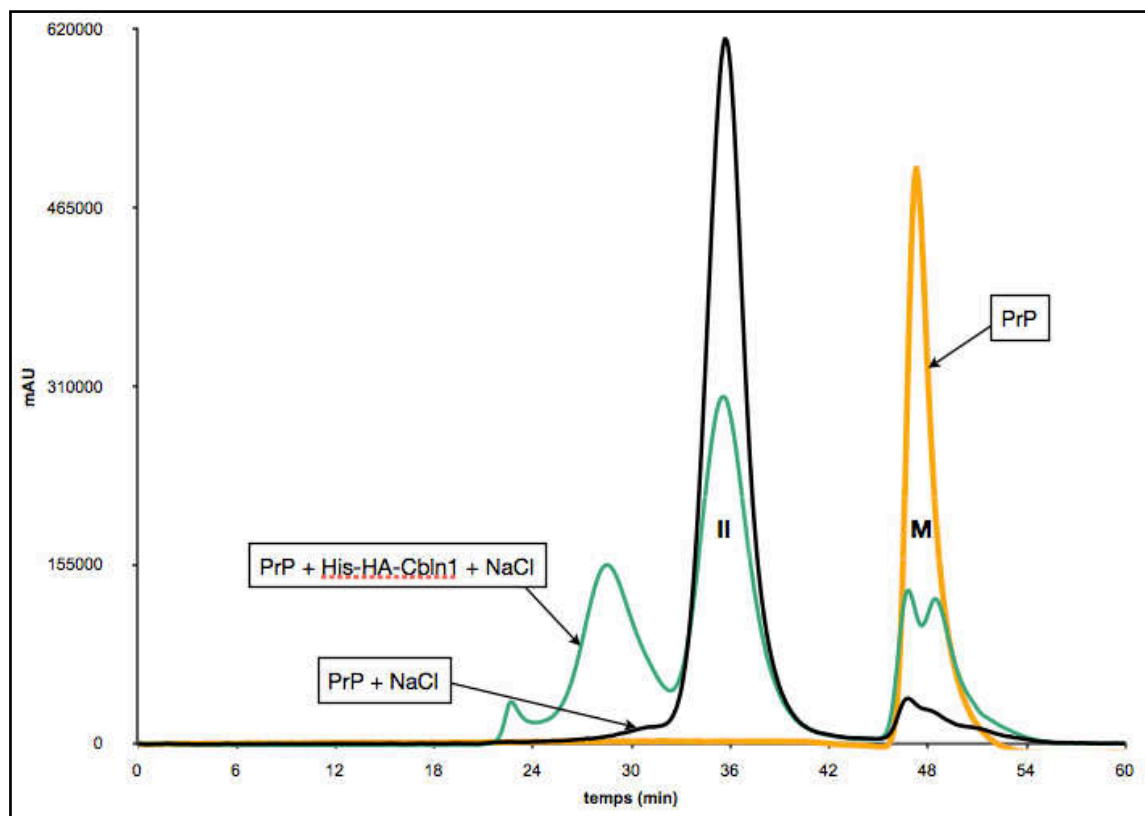


Figure 16 : Analyse par chromatographie d'exclusion des produits d'agrégation de PrP à pH 3 après 18 heures d'incubation à 40°C, avec ou sans NaCl et His-HA-Cbln1. En présence de NaCl, PrP s'agrège en oligomères II. L'agrégation de PrP en présence de NaCl et de Cbln1 entraîne également la formation d'oligomères II mais aussi celle d'espèces de plus haut poids moléculaire, éluées plus rapidement. II, Oligomères II ; M, Monomères.

PrP après 18 heures d'incubation dans les mêmes conditions est sensiblement différent. Le pic correspondant aux oligomères II est considérablement réduit. De plus, un large pic élué plus rapidement apparaît autour de la 28^{ème} minute. Il correspond à la formation d'une espèce oligomérique de plus haut poids moléculaire. Celle-ci semble avoir un poids moléculaire de l'ordre de celui des oligomères I' de PrP, identifiés par Erlich, et al. [21], mais pourrait aussi correspondre à un complexe Cbln1/PrP. Une petite proportion d'espèces de plus haut poids moléculaire est détectée dans le volume mort (temps d'éluion de 25 minutes). Ces données montrent que Cbln1 influence fortement l'oligomérisation de PrP. Cependant, la nature de cette interaction reste à préciser.

Pour aborder cette question, nous avons cherché à savoir sous quel pic se trouve l'His-HA-Cbln1. Des fractions d'éluion sont collectées en sortie de colonne de chromatographie. Leur absorbance est mesurée à 280 nm. Seule l'absorbance de PrP est observable car la contribution de Cbln1 dans

l'absorbance est négligeable vis-à-vis de celle de la PrP. En effet, l'His-HA-Cbln1 a un coefficient d'absorption trois fois plus faible que celui de la PrP et elle est présente en solution à une concentration plus faible que la PrP. Les fractions d'élution sont soumises à une quantification par immunodot de l'His-HA-Cbln1 en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA (figure 17). L'His-HA-Cbln1 est retrouvée de la fraction 23 à la fraction 41. Le profil de l'immunodot indique que Cbln1 est élue principalement sous forme de deux pics successifs. Le premier pic d'His-HA-Cbln1 est élué autour de la 27^{ème} minute, soit environ 1 minute avant le pic d'absorbance. Cela pourrait s'expliquer par la fixation des oligomères de PrP à un ou plusieurs hexamères de Cbln1, étant entendu que les complexes les plus volumineux sont élués les premiers. Le deuxième pic d'His-HA-Cbln1 est élué autour de la 34^{ème} minute. Enfin, Cbln1 est détectée en plus faible quantité, jusqu'à la 41^{ème} minute. Cela pourrait correspondre à l'élution de Cbln1 libre, non complexée.

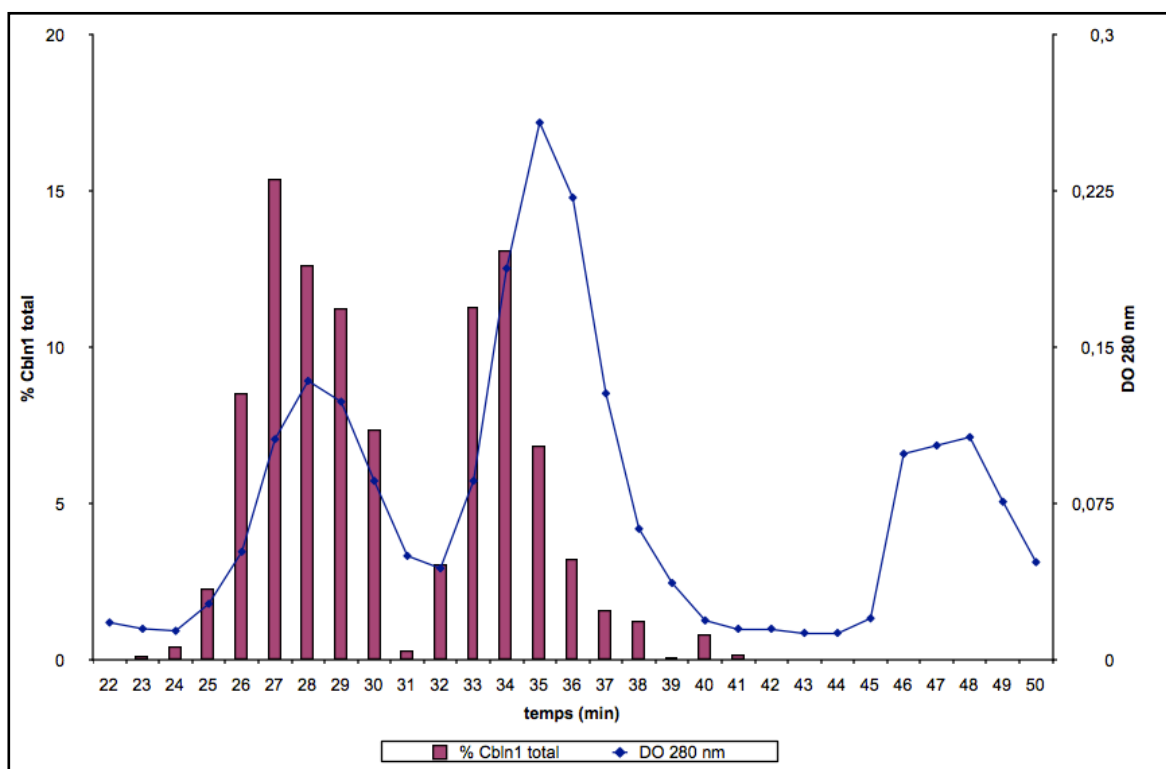


Figure 17 : Profil chromatographique du produit d'agrégation de PrP en présence de Cbln1. Lors de la chromatographie d'exclusion du mélange d'agrégation His-HA-Cbln1/PrP, 29 fractions de 500 μ L sont collectées en sortie de chaîne, à partir de la 21^{ème} minute. L'absorbance est mesurée à 280 nm (courbe). La présence d'His-HA-Cbln1 dans chaque fraction est quantifiée par immunodot en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA (histogramme, exprimé en pourcentage de Cbln1 totale).

Les observations précédentes montrent que l'His-HA-Cbln1 modifie l'oligomérisation de PrP recombinante. Une forme oligomérique de PrP est complexée avec Cbln1, mais la nature de l'oligomère présent dans ce complexe reste à déterminer.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Malgré des avancées significatives dans la compréhension de la biologie de la protéine PrP^C, il reste beaucoup à savoir quant à l'origine des symptômes observés au cours des maladies à prion. A cette fin, il est important d'explorer les partenaires d'interaction du prion.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la fixation de PrP^{Sc} à Cbln1, une protéine de la famille C1q, qui est exprimée et sécrétée spécifiquement par les cellules granulaires du cervelet. Cbln1 est impliquée dans la formation, la maintenance et la plasticité des synapses entre ces cellules et les cellules de Purkinje [39]. Par ailleurs, les souris dont le gène codant pour Cbln1 est invalidé développent une ataxie cérébelleuse qui est également observée chez les souris atteintes d'EST. Nous faisons l'hypothèse que Cbln1 et PrP^C pourraient être impliquées dans une voie de signalisation commune qui est perturbée lors de l'accumulation de PrP^{Sc}. Cette perturbation serait liée à l'interaction de Cbln1 avec PrP^{Sc}, qui conduirait à la perte de fonction de Cbln1.

Cette étude a nécessité la mise au point d'un processus de production de la protéine recombinante Cbln1. Trois arguments ont justifié le choix de la transfection de la lignée cellulaire HEK 293, qui dérive de cellules embryonnaires de rein humain. D'abord, la lignée HEK 293 est d'entretien facile car elle est semi-adhérente et a un cycle de croissance rapide. Ensuite, ces cellules sont reconnues comme étant un véhicule de choix pour la production de protéines recombinantes eucaryotes correctement repliées et glycosylées [62]. Enfin, nos collègues japonais, qui nous ont fourni le plasmide His-HA-Cbln1, ont validé ce processus dans leur laboratoire [39].

La procédure de purification de Cbln1 à partir de surnageants de transfection a été décrite par Ito-Ishida, et al. [39]. Nous avons dû l'adapter afin d'obtenir une protéine pure et aussi concentrée que possible. Après quelques essais préliminaires, nous avons défini un protocole composé de quatre étapes consécutives : concentration des surnageants par ultrafiltration, purification par chromatographie d'affinité au cobalt, dessalage par filtration sur gel, et nouvelle concentration par ultrafiltration.

Nous avons vérifié la taille et la structure quaternaire de la Cbln1 purifiée en gel SDS-PAGE. En condition réductrice, le monomère de Cbln1 migre à environ 35 kDa (monomère) alors qu'en condition non réductrice, Cbln1 se présente sous la forme de dimères (~ 70 kDa), et d'hexamères (~ 210 kDa). Ces résultats sont en accord avec les données publiées par Bao, et al., qui ont montré que Cbln1 est sécrétée sous la forme d'un dimère de trimères [4]

Il serait nécessaire de vérifier la structure secondaire de la protéine que nous avons purifiée par dichroïsme secondaire, une méthode spectroscopique permettant d'évaluer la richesse d'une protéine en hélices α et en feuillets β . Ceci n'a pas été possible pour deux raisons. D'abord, la méthode de production et de purification de Cbln1 ne permet pas d'obtenir une quantité suffisante pour une analyse de ce type. Ensuite, le tampon HEPES dans lequel la protéine est préparée et conservée absorbe considérablement dans l'UV lointain, ce qui entraîne un bruit de fond trop important. Toutefois, nous observons que la protéine sécrétée dans le milieu est purifiée par la suite sous forme d'hexamères. Elle est donc vraisemblablement correctement repliée.

Afin d'étudier l'interaction entre PrP et Cbln1, nous avons d'abord montré par ELISA que les hexamères solubles de Cbln1 fixent la PrP immobilisée de manière dose-dépendante. Cette interaction atteint un plateau, ce qui indique une interaction saturable. La spécificité de cette interaction doit encore être confirmée par des expériences de compétition entre Cbln1 et un anticorps anti-PrP.

L'analyse des courbes de SPR confirme cette interaction dose dépendante et suggère une affinité de la fixation de Cbln1 sur la PrP modifiée de l'ordre du nanomolaire. Le calcul de la constante d'équilibre K_D n'a pas été possible par le logiciel BiaEvaluation. En effet, la différence de salinité entre la solution protéique et le tampon de course BiaCore entraîne de fortes variations du signal à chaque changement de tampon, ce qui empêche la modélisation mathématique satisfaisante des courbes. En outre, les courbes de SPR montrent une dissociation très lente, ce qui évoque un phénomène d'avidité difficilement modélisable.

Blanquet-Grossard, et al. ont montré que PrP subit un changement conformationnel lors de son immobilisation sur plaque ELISA ou sur puce de

détection de SPR : elle acquiert une conformation «Sc-like», similaire à celle de PrP^{Sc}. Cbln1 fixe donc, comme C1q, une forme modifiée de PrP.

PrP^{Sc} est une forme modifiée de PrP^C, qui a tendance à s'agréger. Comme PrP^{Sc}, les oligomères de PrP recombinante sont riches en feuillets β et sont partiellement résistants à la protéolyse. Nous avons donc cherché à savoir si les oligomères solubles de PrP fixent Cbln1, en comparaison avec les monomères. Nous avons alors montré par la méthode ELISA que les oligomères II solubles de PrP se fixent de manière dose-dépendante à l'His-HA-Cbln1 immobilisée, alors que les monomères ne la fixent pas.

L'interaction entre la Cbln1 immobilisée et les oligomères de PrP n'a pas pu être mise en évidence par résonance plasmonique de surface. En effet, les oligomères de PrP peuvent se fixer de façon non spécifique sur de nombreux supports, ce qui rend difficile l'obtention d'un témoin négatif.

Curieusement, le cuivre s'est révélé indispensable dans nos essais de résonance plasmonique de surface avec immobilisation de PrP, alors que les conditions expérimentales d'ELISA n'ont pas nécessité l'ajout de cuivre. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par l'utilisation de Sérum Albumine Bovine (SAB) au cours des ELISA. La SAB, qui possède plusieurs sites de fixation du cuivre d'affinité variables [71], fournirait une quantité de cuivre suffisante pour la fixation de Cbln1 sur PrP immobilisée.

Ensuite, nous avons cherché à observer l'influence de Cbln1 sur le processus d'agrégation de PrP par chromatographie d'exclusion de taille. Le profil d'élution du mélange d'agrégation Cbln1/PrP montre des différences significatives avec les produits d'agrégation de la PrP seule. Le pic d'oligomères II est sensiblement diminué et il se forme un large pic qui correspond à une nouvelle espèce d'oligomères, de plus haut poids moléculaire. Ainsi, Cbln1 modifie radicalement l'oligomérisation de PrP.

Afin de vérifier que Cbln1 se complexe à PrP au cours de son oligomérisation, nous avons analysé par immunodot les fractions éluées en chromatographie. Le profil d'élution de Cbln1 montre que celle-ci est éluée en deux temps. Cbln1 peut être éluée sous forme libre mais elle est aussi

retrouvée sous le pic de protéines de haut poids moléculaire, ce qui suggère la complexation de Cbln1 à des oligomères de PrP.

Il reste à déterminer la structure de ces complexes ou encore le ratio Cbln1/oligomères. La microscopie électronique pourrait nous en donner un aperçu et confirmer si, comme pour C1q, la fixation des oligomères de PrP sur Cbln1 se fait au niveau des têtes globulaires. D'autre part, l'étude de la cinétique d'agrégation de PrP par le suivi de la fluorescence de la thioflavine T pourrait mettre en évidence le type d'influence de Cbln1 sur l'oligomérisation de PrP. La thioflavine T est un marqueur dont la fluorescence augmente lors de sa fixation à des structures riches en feuillet β , telles que la PrP oligomérisée.

En conclusion, nous avons mis en évidence l'interaction de Cbln1 avec les oligomères de PrP, qui représentent notre modèle *in vitro* de PrP^{Sc}. En revanche, les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent inconnues. Par exemple, notre laboratoire a montré que C1q inhibe la cytotoxicité intrinsèque des oligomères II solubles de PrP en culture cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si le même phénomène peut être observé avec Cbln1.

D'autre part, Matsuda, et al. ont montré que Cbln1 est un ligand du récepteur orphelin GluD2 [46]. La fixation de Cbln1 aux oligomères de PrP^{Sc} pourrait la détourner de sa fonction dans cette voie de signalisation cellulaire. Nous pourrions aborder cette question en comparant la fixation de Cbln1 sur GluD2 en présence ou non d'oligomères II solubles de PrP recombinante.

De nombreuses molécules chimiques sont connues pour avoir la propriété de réduire la charge en PrP^{Sc} *in cellulo*. Certaines d'entre elles actuellement sont testées en thérapeutique ou l'ont été. Une étude récente a montré qu'aucune de ces molécules n'interagit directement avec PrP^C. Cela tend à indiquer que ces molécules «anti-prion» agissent indirectement *via* des cibles cellulaires non-PrP [52]. L'interaction que nous avons montrée nous amène à proposer que Cbln1 est une de ces cibles. Nous pouvons imaginer que la fixation d'une de ces molécules à Cbln1 pourrait inhiber sa séquestration par les oligomères de PrP, sans toutefois la détourner de sa fonction biologique. Ces observations participeraient à la compréhension

d'une partie des mécanismes mis en jeu dans le traitement des EST et à l'optimisation des thérapeutiques anti-prion.

Enfin, Cbln1 appartient au groupe des protéines Cbln, dont quatre membres ont été décrits à ce jour. Tout comme Cbln1, Cbln3 est exprimée dans le cervelet. Cbln1 est indispensable à la sécrétion de Cbln3 sous la forme d'un dimère d'hétérotrimères Cbln1/Cbln3. Il est envisageable que cet hexamère hétérogène se comporte différemment du dimère de trimères de Cbln1 vis-à-vis de ses partenaires.

En conclusion, la mise au point de la production de Cbln1 au laboratoire a permis d'obtenir un faisceau d'observations qui suggère la complexation d'oligomères de PrP avec Cbln1. La colocalisation de ces deux protéines dans les synapses entre les cellules granulaires et les cellules de Purkinje du cervelet permet de penser que cette interaction est relevante d'un point de vue physiopathologique. Ces résultats préliminaires confortent les données obtenues par Erlich, et al. et tendent à confirmer notre hypothèse selon laquelle d'autres protéines de la famille C1q pourraient jouer un rôle dans les mécanismes physiopathologiques des maladies à prion.

THÈSE SOUTENUE PAR : Vissal David KHEAV

TITRE : Étude de l'interaction de la protéine prion avec Cbln1, une protéine de la famille C1q

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 31/8/2011

LE DOYEN ET PRÉSIDENT DU JURY DE THÈSE,

Professeur Christophe RIBUOT



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwaelder, M., *Molecular mechanisms of prion pathogenesis*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 11-40.
2. Alper, T., Haig, D.A., and Clarke, M.C., *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **22**(3): p. 278-84.
3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
4. Bao, D., Pang, Z., and Morgan, J.I., *The structure and proteolytic processing of Cbln1 complexes*. J Neurochem, 2005. **95**(3): p. 618-29.
5. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., and Weissmann, C., *Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene*. Cell, 1986. **46**(3): p. 417-28.
6. Blanquet-Grossard, F., Thielens, N.M., Vendrely, C., Jamin, M., and Arlaud, G.J., *Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein*. Biochemistry, 2005. **44**(11): p. 4349-56.
7. Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., and LeBlanc, A., *Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39145-9.
8. Brandel, J.P., Beaudry, P., Delasnerie-Laupretre, N., and Laplanche, J.L., *[Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic value of protein 14-3-3 and neuronal specific enolase assay in cerebrospinal fluid]*. Rev Neurol (Paris), 1999. **155**(2): p. 148-51.
9. Brown, D.R. and Besinger, A., *Prion protein expression and superoxide dismutase activity*. Biochem J, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 423-9.
10. Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C.J., *Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 498-501.
11. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C., *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie*. Cell, 1993. **73**(7): p. 1339-47.
12. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
13. Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F., *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 685-90.
14. Collins, S.J., Sanchez-Juan, P., Masters, C.L., Klug, G.M., van Duijn, C., Poggi, A., Pocchiari, M., Almonti, S., Cuadrado-Corrales, N., de Pedro-Cuesta, J., Budka, H., Gelpi, E., Glatzel, M., Tolnay, M., Hewer, E., Zerr, I., Heinemann, U., Kretschmar, H.A., Jansen, G.H., Olsen, E., Mitrova, E., Alperovitch, A., Brandel, J.P., Mackenzie, J., Murray, K., and Will, R.G., *Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 9): p. 2278-87.
15. De Luigi, A., Colombo, L., Diomede, L., Capobianco, R., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Forloni, G., Tagliavini, F., and Salmona, M., *The*

- efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection.* PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1888.
16. Deleault, N.R., Harris, B.T., Rees, J.R., and Supattapone, S., *Formation of native prions from minimal components in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9741-6.
 17. Dickinson, A.G. and Taylor, D.M., *Resistance of scrapie agent to decontamination.* N Engl J Med, 1978. **299**(25): p. 1413-4.
 18. Dickinson, J., Murdoch, H., Dennis, M.J., Hall, G.A., Bott, R., Crabb, W.D., Penet, C., Sutton, J.M., and Raven, N.D., *Decontamination of prion protein (BSE301V) using a genetically engineered protease.* J Hosp Infect, 2009. **72**(1): p. 65-70.
 19. Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B., and Cowen, D., *Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease.* N Engl J Med, 1974. **290**(12): p. 692-3.
 20. Dumestre-Perard, C., Osmundson, J., Lemaire-Vieille, C., Thielens, N., Grives, A., Favier, B., Csopaki, F., Jamin, M., Gagnon, J., and Cesbron, J.Y., *Activation of classical pathway of complement cascade by soluble oligomers of prion.* Cell Microbiol, 2007. **9**(12): p. 2870-9.
 21. Erlich, P., Dumestre-Perard, C., Ling, W.L., Lemaire-Vieille, C., Schoehn, G., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Gagnon, J., and Cesbron, J.Y., *Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers.* J Biol Chem, 2010.
 22. EUROCID, *Genetic epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe.* Rev Neurol (Paris), 2001. **157**(6-7): p. 633-7.
 23. Flores-Langarica, A., Sebti, Y., Mitchell, D.A., Sim, R.B., and MacPherson, G.G., *Scrapie pathogenesis: the role of complement C1q in scrapie agent uptake by conventional dendritic cells.* J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1305-13.
 24. Fu, H., Subramanian, R.R., and Masters, S.C., *14-3-3 proteins: structure, function, and regulation.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 617-47.
 25. Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J.C., and Arlaud, G.J., *The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties.* J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46974-82.
 26. Gadjusek, D.C., Gibbs, C.J., and Alpers, M., *Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees.* Nature, 1966. **209**: p. 794-6.
 27. Gadjusek, D.C. and Zigas, V., *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population.* N Engl J Med, 1957. **257**(20): p. 974-8.
 28. Ghai, R., Waters, P., Roumenina, L.T., Gadjeva, M., Kojouharova, M.S., Reid, K.B., Sim, R.B., and Kishore, U., *C1q and its growing family.* Immunobiology, 2007. **212**(4-5): p. 253-66.
 29. Gibbs, C.J., Gadjusek, D.C., and Asher, D.M., *CJ disease : transmission to chimpanzee.* Science, 1968. **161**: p. 388-9.
 30. Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I.,

- Martins, V.R., and Brentani, R.R., *Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **76**(1): p. 85-92.
31. Hadlow, W.J., *Scrapie and kuru*. Lancet, 1959(2): p. 289-90.
 32. Hadlow, W.J., Kennedy, R.C., and Race, R.E., *Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus*. J Infect Dis, 1982. **146**(5): p. 657-64.
 33. Hirai, H., Pang, Z., Bao, D., Miyazaki, T., Li, L., Miura, E., Parris, J., Rong, Y., Watanabe, M., Yuzaki, M., and Morgan, J.I., *Cbln1 is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum*. Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1534-41.
 34. Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C.J., Lee, K.H., and Harrington, M.G., *The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies*. N Engl J Med, 1996. **335**(13): p. 924-30.
 35. Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., and Houston, F., *Transmission of prion diseases by blood transfusion*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 11): p. 2897-905.
 36. Iijima, T., Miura, E., Matsuda, K., Kamekawa, Y., Watanabe, M., and Yuzaki, M., *Characterization of a transneuronal cytokine family Cbln--regulation of secretion by heteromeric assembly*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(4): p. 1049-57.
 37. INVS. *Maladie de Creutzfeldt-Jakob et maladies apparentées*. May 2011 [cited 2011 August]; Available from: http://www.invs.sante.fr/publications/mcj/donnees_mcj.html.
 38. Ironside, J.W., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Haemophilia, 2010. **16 Suppl 5**: p. 175-80.
 39. Ito-Ishida, A., Miura, E., Emi, K., Matsuda, K., Iijima, T., Kondo, T., Kohda, K., Watanabe, M., and Yuzaki, M., *Cbln1 regulates rapid formation and maintenance of excitatory synapses in mature cerebellar Purkinje cells in vitro and in vivo*. J Neurosci, 2008. **28**(23): p. 5920-30.
 40. Le Pichon, C.E. and Firestein, S., *Expression and localization of the prion protein PrP(C) in the olfactory system of the mouse*. J Comp Neurol, 2008. **508**(3): p. 487-99.
 41. Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., and Firestein, S., *Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice*. Nat Neurosci, 2009. **12**(1): p. 60-9.
 42. Loeuillet, C., Boelle, P.Y., Lemaire-Vieille, C., Baldazza, M., Naquet, P., Chambon, P., Cesbron-Delauw, M.F., Valleron, A.J., Gagnon, J., and Cesbron, J.Y., *Sex effect in mouse and human prion disease*. J Infect Dis, 2010. **202**(4): p. 648-54.
 43. Mabbott, N.A., Bruce, M.E., Botto, M., Walport, M.J., and Pepys, M.B., *Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 485-7.
 44. Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klöhn, P.C., Brandner, S., and Collinge, J., *Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis*. Science, 2003. **302**(5646): p. 871-4.
 45. Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J., *129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes*

- mRNA production are developmentally normal. Mol Neurobiol, 1994. 8 (2-3): p. 121-7.*
46. Matsuda, K., Miura, E., Miyazaki, T., Kakegawa, W., Emi, K., Narumi, S., Fukazawa, Y., Ito-Ishida, A., Kondo, T., Shigemoto, R., Watanabe, M., and Yuzaki, M., *Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. Science, 2010. 328(5976): p. 363-8.*
 47. Oesch, B., Westaway, D., and Wälchli, M., *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, 1985. 40: p. 735-46.*
 48. Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci, 1995. 4(11): p. 2411-23.*
 49. Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichemberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P., and Kretzschmar, H., *Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. Ann Neurol, 1999. 46(2): p. 224-33.*
 50. Pattison, I.H., *Resistance of the Scrapie Agent to Formalin. J Comp Pathol, 1965. 75: p. 159-64.*
 51. Pocchiari, M., Puopolo, M., Croes, E.A., Budka, H., Gelpi, E., Collins, S., Lewis, V., Sutcliffe, T., Guillivi, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J.P., Alperovitch, A., Zerr, I., Poser, S., Kretzschmar, H.A., Ladogana, A., Rietvald, I., Mitrova, E., Martinez-Martin, P., de Pedro-Cuesta, J., Glatzel, M., Aguzzi, A., Cooper, S., Mackenzie, J., van Duijn, C.M., and Will, R.G., *Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. Brain, 2004. 127(Pt 10): p. 2348-59.*
 52. Poncet-Montange, G., St Martin, S.J., Bogatova, O.V., Prusiner, S.B., Shoichet, B.K., and Ghaemmaghami, S., *A Survey of Antiprion Compounds Reveals the Prevalence of Non-PrP Molecular Targets. J Biol Chem. 286(31): p. 27718-28.*
 53. Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Winnacker, E.L., and Famulok, M., *Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. ChemBiochem, 2002. 3(8): p. 717-25.*
 54. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science, 1982. 216(4542): p. 136-44.*
 55. Rezaei, H., Marc, D., Choiset, Y., Takahashi, M., Hui Bon Hoa, G., Haertle, T., Grosclaude, J., and Debey, P., *High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. Eur J Biochem, 2000. 267(10): p. 2833-9.*
 56. Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C., *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature, 2001. 411(6839): p. 810-3.*
 57. Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., and Caughey, B., *The most infectious prion protein particles. Nature, 2005. 437(7056): p. 257-61.*
 58. Simoneau, S., Rezaei, H., Sales, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J.,

- Schatzl, H., and Lasmezas, C.I., *In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers*. PLoS Pathog, 2007. **3**(8): p. e125.
59. Singh, A., Beveridge, A.J., and Singh, N., *Decreased CSF Transferrin in sCJD: A Potential Pre-Mortem Diagnostic Test for Prion Disorders*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e16804.
 60. Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., and Barres, B.A., *The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1164-78.
 61. Tateishi, J., Kitamoto, T., Hoque, M.Z., and Furukawa, H., *Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents*. Neurology, 1996. **46**(2): p. 532-7.
 62. Thomas, P. and Smart, T.G., *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **51**(3): p. 187-200.
 63. Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M., *Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum*. Cell, 2010. **141**(6): p. 1068-79.
 64. Valleron, A.J., Boelle, P.Y., Chatignoux, E., and Cesbron, J.Y., *Can a second wave of new variant of the CJD be discarded in absence of observation of clinical non Met-Met cases?* Rev Epidemiol Sante Publique, 2006. **54**(2): p. 111-5.
 65. Viegas, P., Chaverot, N., Enslin, H., Perriere, N., Couraud, P.O., and Cazaubon, S., *Junctional expression of the prion protein PrPC by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 22): p. 4634-43.
 66. White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S., *Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 80-3.
 67. Yang, Q., Hashizume, Y., Yoshida, M., and Wang, Y., *Neuropathological study of cerebellar degeneration in prion disease*. Neuropathology, 1999. **19**(1): p. 33-9.
 68. Yuzaki, M., *Cbln and C1q family proteins: new transneuronal cytokines*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1698-705.
 69. Zanusso, G., Ferrari, S., Cardone, F., Zampieri, P., Gelati, M., Fiorini, M., Farinazzo, A., Gardiman, M., Cavallaro, T., Bentivoglio, M., Righetti, P.G., Pocchiari, M., Rizzuto, N., and Monaco, S., *Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. N Engl J Med, 2003. **348**(8): p. 711-9.
 70. Zerr, I., Kallenberg, K., Summers, D.M., Romero, C., Taratuto, A., Heinemann, U., Breithaupt, M., Varges, D., Meissner, B., Ladogana, A., Schuur, M., Haik, S., Collins, S.J., Jansen, G.H., Stokin, G.B., Pimentel, J., Hewer, E., Collie, D., Smith, P., Roberts, H., Brandel, J.P., van Duijn, C., Pocchiari, M., Begue, C., Cras, P., Will, R.G., and Sanchez-Juan, P., *Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain, 2009. **132**(Pt 10): p. 2659-68.

71. Zgirski, A. and Frieden, E., *Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin*. J Inorg Biochem, 1990. **39**(2): p. 137-48.

SERMENT DE GALIEN



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».



KHEAV Vissal David

Thèse soutenue publiquement le 22 septembre 2011

TITRE :

Etude de l'interaction de la protéine prion avec Cbln1, une protéine de la famille C1q

RÉSUMÉ :

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives fatales. Elles sont caractérisées par l'accumulation dans le système nerveux central de prion, c'est-à-dire de la protéine PrP^{Sc} (Scrapie, la tremblante du mouton), isoforme anormale de la PrP^c (Cellulaire). Cette accumulation est initiée par la formation d'oligomères solubles de PrP^{Sc}, associés à l'infectivité et à la neurotoxicité du prion. A ce jour, il n'existe aucun moyen d'établir un diagnostic de certitude d'EST avant le décès des patients, ni aucun traitement efficace validé.

C1q, la molécule de reconnaissance de la voie classique du complément, interagit spécifiquement avec les oligomères de PrP^{Sc} via ses têtes globulaires. C1q appartient à la famille C1q. Les protéines de cette famille sont caractérisées par un domaine globulaire carboxy-terminal très conservé, qui est responsable de leurs propriétés de reconnaissance. Nous nous sommes intéressés à Cbln1, une protéine de cette famille, qui est présente, comme PrP, dans les cellules granulaires et de Purkinje du cervelet. Pour la première fois, nous avons montré que Cbln1, purifiée à partir d'extrait de culture cellulaire, interagit de façon dose-dépendante avec la PrP recombinante. Cette fixation est mise en évidence avec les oligomères solubles de PrP (8 à 15 sous-unités) alors que nous ne l'observons pas avec la protéine monomérique. Nous avons ensuite démontré que Cbln1 influence l'étape d'oligomérisation de PrP. Ces résultats suggèrent que la fixation des oligomères solubles de PrP par Cbln1 pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des maladies à prion.

MOTS CLÉS : prion, oligomères, Cbln1, ELISA, SPR

JURY : Monsieur le Professeur Christophe Ribuot - Président du jury

Monsieur le Professeur Jean-Yves Cesbron

Madame le Docteur Chantal Dumestre-Perard

Madame le Docteur Catherine Lemaire-Vieille