

# Modèles en culture cellulaire des encéphalopathies spongiformes transmissibles

Sylvain Lehmann<sup>a\*</sup>, Florence Béranger<sup>a</sup>, Jérôme Solassol<sup>a</sup>, Audrey Ceschia<sup>a</sup>, Véronique Perrier<sup>a</sup>, Aude De Gassart<sup>a</sup>, Didier Vilette<sup>b</sup>, Hubert Laude<sup>b</sup>, Odile Kellermann<sup>c</sup>, Alain Mangé<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut de génétique humaine, CNRS UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France

<sup>b</sup> Virologie et immunologie moléculaires, Inra, 78352 Jouy en Josas cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire de différenciation cellulaire et prions, CNRS UPR 1983-Institut Pasteur, BP 8, 94801 Villejuif, France

Reçu le 6 juin 2001 ; accepté le 25 juin 2001

Présenté par Jean Rosa

---

**Abstract – Prion diseases and cell cultures.** Cell cultures represent versatile and useful experimental models of transmissible spongiform encephalopathies. These models include chronically prion infected cell lines, as well as cultures expressing variable amounts of wild-type, mutated or chimeric prion proteins. These cultures have been widely used to investigate the biology of both the normal and the pathological isoform of the prion protein. They have also contributed to the comprehension of the pathogenic processes occurring in transmissible spongiform encephalopathies and in the development of new therapeutic approaches of these diseases. To cite this article: S. Lehmann et al., C. R. Biologies, 325 (2002) 59–65. © 2002 Académie des Sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

**prion / neurodegeneration / cell culture**

**Résumé –** L'utilisation de cultures cellulaires permet d'aborder la plupart des questions scientifiques relatives aux recherches sur les encéphalopathies spongiformes transmissibles. Ces modèles *in vitro* comprennent principalement des lignées infectées de façon chronique par les prions ou qui expriment des quantités variables de protéines du prion normales, mutées ou chimériques. Ces cultures cellulaires ont permis d'aborder de façon détaillée la biologie cellulaire de la protéine du prion normale et pathologique. Elles ont également contribué à la compréhension des mécanismes pathologiques des encéphalopathies spongiformes transmissibles et au développement de nouvelles approches thérapeutiques de ces affections. Pour citer cet article : S. Lehmann et al., C. R. Biologies, 325 (2002) 59–65. © 2002 Académie des Sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

**prion / neurodégénérescence / culture cellulaire**

---

## 1. Introduction

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) se manifestent par une neurodégénérescence spongiforme du système nerveux central et affectent

aussi bien les animaux que les hommes [1]. L'évènement pathologique central de ces maladies semble être la conversion d'une protéine appelée PrP<sup>C</sup>, pour forme cellulaire de la protéine prion, vers une isoforme pathologique PrP<sup>Sc</sup>, pour forme 'scrapie' de la PrP [2].

---

\*Correspondance et tirés à part.

Adresse e-mail : Sylvain.Lehmann@igh.cnrs.fr (S. Lehmann).

Il existe encore de nombreuses incertitudes concernant la fonction normale de la PrP<sup>C</sup> et les mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence et la transmission des EST. D'une façon générale, les cultures cellulaires facilitent grandement l'étude de protéines d'intérêt en permettant l'utilisation de techniques microscopiques et biochimiques très variées. Dans le cadre des EST, ces modèles ont permis des avancées significatives de nos connaissances que nous rapportons dans cette revue.

## 2. Principaux modèles en culture cellulaire utilisés dans le cadre de l'étude des EST

### 2.1. Cultures cellulaires classiques et transfectées avec de la PrP sauvage

L'identification d'une protéine, appelée PrP<sup>Sc</sup>, dans les fractions infectieuses responsables des EST [2] a été une étape déterminante dans l'étude et la compréhension de ces maladies. Il a été rapidement établi que la PrP<sup>Sc</sup> était une forme anormale d'une protéine cellulaire physiologique, la PrP<sup>C</sup>. Cette dernière est exprimée de façon quasi ubiquitaire dans l'organisme [3] et par un grand nombre de cultures cellulaires [4–6]. C'est dans les cellules neuronales que la PrP est la plus

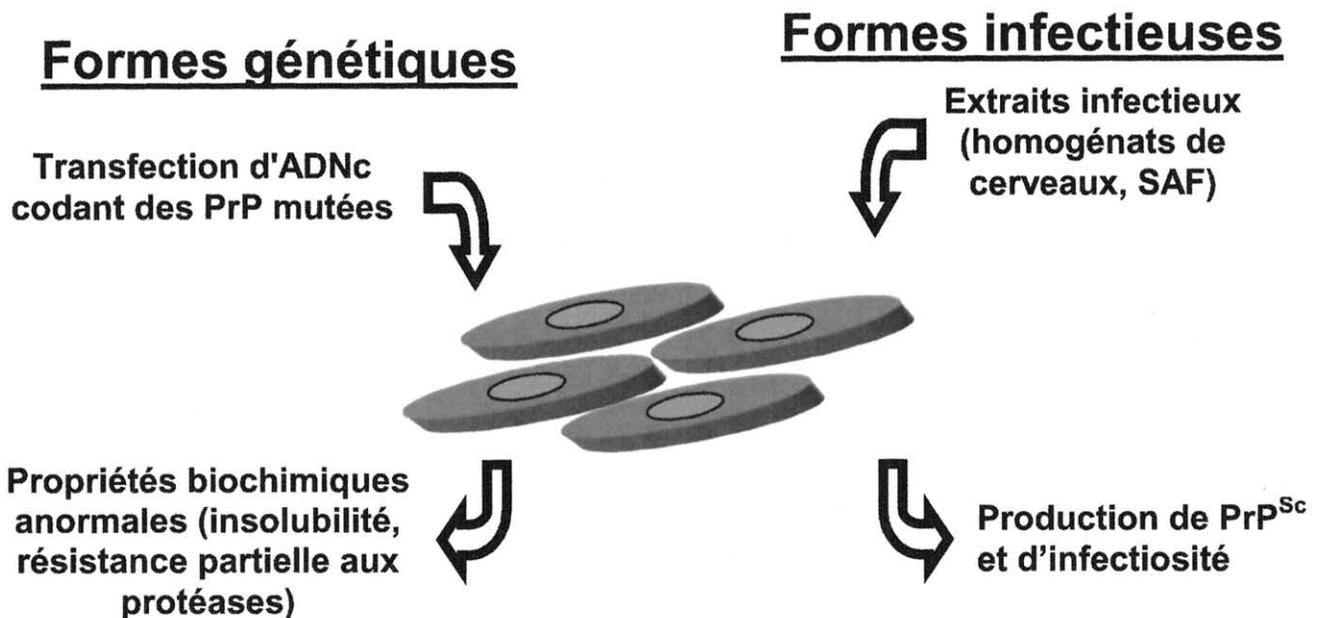
fortement exprimée et que les études les plus détaillées de la biologie cellulaire de la PrP<sup>C</sup> et de la PrP<sup>Sc</sup> ont été réalisées. Afin d'augmenter artificiellement la quantité de PrP exprimée en culture et de faciliter la détection et la purification de la protéine, plusieurs groupes ont développé des lignées qui sur-expriment la PrP<sup>C</sup> après transfection [7–10].

### 2.2. Cultures cellulaires transfectées avec des PrP modifiées

La description de mutations de la PrP associées aux formes génétique d'EST [11] a conduit logiquement à s'intéresser à l'expression de ces PrP mutées dans des systèmes en cultures cellulaires [6]. Ce n'est en fait qu'en 1995 qu'un modèle dans lequel les PrP mutées présentaient des propriétés biochimiques anormales a été établi [7] (voir *figure 1*). Ces cultures ont permis d'étudier en détail les mécanismes pathologiques liés aux mutations [8, 12–15]. Parallèlement à ces modèles des formes génétiques des EST, des PrP chimériques et tronquées ont été exprimées en culture cellulaire dans des buts variés d'étude de la fonction ou de la conversion de la protéine [16, 17].

### 2.3. Cultures cellulaires issues de souris transgéniques

L'obtention de souris transgéniques dénuées du gène codant la PrP (PrP<sup>-/-</sup>) [18] a fait date en montrant que



**Figure 1.** Modèles cellulaires des formes génétiques et infectieuses des EST. Les PrP portant des mutations homologues à celles présentes chez les patients atteints des formes génétiques d'EST acquièrent après transfection en culture cellulaire (partie droite de la figure), des propriétés biochimiques anormales. Afin de générer des lignées cellulaires chroniquement infectées par les prions (partie gauche de la figure), les cultures sont mises en contact avec des extraits infectieux et la présence de PrP<sup>Sc</sup> et d'infectiosité est testée après repiquage successif.

cette protéine était nécessaire au développement et à la transmission des EST. Par ailleurs, la création de souris sur-exprimant la PrP sauvage et ayant une durée d'incubation réduite [19], de même que celle de souris sur-exprimant une PrP mutée [20] et tombant spontanément malades ont également été des découvertes essentielles. De nombreuses autres lignées de souris transgéniques produisant des PrP modifiées ont été établies depuis [19]. Ces modèles transgéniques ont permis de dériver des cultures primaires exprimant différents niveaux de PrP et/ou des PrP mutées. Nous citerons en particulier des lignées neuronales issues de souris PrP  $-/-$  qui ont été ensuite immortalisées [21].

#### 2.4. Cultures cellulaires infectées

Historiquement, la propagation de l'agent infectieux des EST en culture a été testée dès 1970 [22]. Ces travaux ont été poursuivis par Rubenstein en 1984 [23], puis surtout par le groupe de Chesebro [24] et de Prusiner [25] notamment. Le principe de la génération de ces lignées repose sur la mise en contact de cellules avec des extraits infectieux bruts (homogénats 5 de cerveaux) ou purifiés (SAF, 'scrapie associated fibrills') (voir *figure 1*). La présence d'infectiosité testée par inoculation à l'animal permet de confirmer la réussite de l'infection, de même que la détection biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> qui est plus rapide et plus simple à mettre en oeuvre [26]. En 1997, Schatzl décrivait une nouvelle lignée cellulaire sensible aux prions [27] mais le faible nombre de lignées cellulaires infectées, ainsi que la restriction des résultats positifs à certaines souches adaptées à la souris [28], montrent que de nombreux paramètres limitent la multiplication de l'agent en culture. La quantité de PrP générée de même que la similitude des PrP produites par les cultures et dans l'inoculum semblent bien essentielles [28].

Par contre, les résultats de Vilette et al. [10] qui ont montré que des cellules épithéliales de lapin exprimant une PrP bovine sont sensibles aux homogénats de tremblants montrent clairement que des cellules non-neuronales sont capables de répliquer l'agent et qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une lignée cellulaire de même origine que la PrP exprimée pour permettre l'infection.

### 3. Utilisation des cultures cellulaires dans l'étude de la biologie de la PrP<sup>C</sup>

#### 3.1. Etude du cheminement intracellulaire de la PrP<sup>C</sup>

Les cultures cellulaires exprimant naturellement ou après transfection des quantités significatives de PrP,

ont permis l'identification des grandes étapes du cheminement intracellulaire de la PrP. Des techniques d'immunofluorescence, d'immuno-réplique, d'immuno-précipitation, de marquage métabolique, de marquage par iodination ou biotinylation et de cross-linking ont été utilisées pour réaliser ces études. Ainsi, il a pu être confirmé que la PrP est une glycoprotéine ancrée à la surface cellulaire par une ancre glycerophosphatidylinositol [29]. Comme d'autres molécules glypiées, elle est associée à des domaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides ou DRM pour 'detergent resistant microdomains' [30, 31]. Une fois à la surface cellulaire, elle suit un cycle rapide d'endocytose et de recyclage au cours duquel elle est clivée dans sa partie centrale [32, 33].

Malgré les avancées récentes, de nombreuses incertitudes subsistent concernant la biologie cellulaire de cette protéine. Ainsi, il n'y a pas de consensus sur le procédé et la voie d'endocytose de la protéine, sur sa dégradation ou encore sur l'importance que revêt son clivage (pour revue voir [33]).

#### 3.2. Etude de la fonction de la PrP

La détermination de la fonction de la PrP est un sujet d'une importance capitale. L'étude du phénotype des souris transgéniques PrP  $-/-$  n'a pas permis de donner de réponse satisfaisante compte tenu des faibles effets produits par l'absence de la protéine [19]. Par contre, en utilisant des cultures cellulaires dérivées d'animaux PrP  $-/-$ , des informations plus pertinentes ont été obtenues. Il a ainsi pu être montré que l'expression de la PrP semblait être corrélée à la sensibilité des cultures au stress oxydant, à l'activité d'enzymes telle que la super-oxyde dismutase Cu/Zn ou encore à l'incorporation de cuivre [34–36]. Ceci évoque d'ailleurs la description en culture cellulaire d'une activité 'anti-oxydante' de type 'super-oxyde dismutase' associée à la PrP [34, 37]. Enfin, le rôle de la PrP dans une cascade de signalisation passant par la src kinase Fyn et impliquant la cavéoline a été mise en évidence dans une lignée neuronale [38]. Ce dernier résultat marque une avancée considérable dans la compréhension du rôle de la PrP. Les prochaines étapes consisteront à déterminer la nature du signal physiologique induisant cette cascade et les conséquences de cette dernière.

#### 3.3. Recherche des partenaires et des récepteurs de la PrP

La recherche de partenaires et de récepteurs de la PrP a été poursuivie *in vitro* notamment par des approches en double hybride [39, 40]. En culture cellulaire, très peu de molécules ont pu être caractérisées. Cela tient probablement aux difficultés à isoler la PrP<sup>C</sup> native

sous forme soluble pour des études de 'binding'. D'autre part, l'affinité relative de la PrP aux glycosaminoglycanes [41] rend difficile la caractérisation à la surface cellulaire de récepteurs de haute affinité [42]. Parmi les molécules qui semblent les plus intéressantes, on peut citer le récepteur à la laminine [43], le dystroglycane [44] et la cavéoline [38].

## 4. Utilisation des cultures cellulaires dans l'étude de la biologie de la PrP<sup>Sc</sup>

### 4.1. Etude de la localisation de la PrP<sup>Sc</sup>

L'obtention de cultures cellulaires infectées a permis d'étudier la localisation de la forme pathologique de la PrP<sup>Sc</sup>. Ces études sont cependant délicates car pour différencier la PrP<sup>C</sup> de la PrP<sup>Sc</sup>, on utilise les propriétés de résistance à la digestion par la protéinase K de la PrP<sup>Sc</sup> (un traitement qui préserve mal les structures cellulaires). Dans les cultures, la PrP<sup>Sc</sup> a été premièrement retrouvée concentrée dans les lysosomes [45]. Par la suite des études ont montré que la PrP<sup>Sc</sup> était associée au DRM [46, 47] et présente en quantité non négligeable à la surface cellulaire [13]. L'enjeu de cette localisation cellulaire repose sur la détermination du compartiment cellulaire impliqué dans la conversion.

### 4.2. Étude de la conversion de la PrP

Disposant de modèles cellulaires dans lesquels la PrP<sup>Sc</sup> était produite, il a été possible de mettre en évidence les facteurs importants dans la conversion de la PrP. Des expériences ont montré que la PrP<sup>Sc</sup> était générée à partir de la PrP<sup>C</sup> endogène vraisemblablement au cours des phases d'endocytose et de recyclage de la protéine [48, 49]. En ce qui concerne les PrP mutées, il semble par contre qu'elles acquièrent des propriétés anormales dès leur synthèse et leur translocation dans le réticulum endoplasmique [12]. Cela suggère qu'un mécanisme de conversion différent existerait dans les formes génétiques d'EST. Les cultures cellulaires ont enfin permis d'étudier en détail les phénomènes de barrière d'espèces. En transfectant des PrP modifiées dans des cultures infectées il a été ainsi mis en évidence des résidus qui joueraient un rôle fondamental dans le passage d'une espèce à une autre [50, 51]. Les différentes tentatives d'infection de cultures cellulaires ont également révélé l'existence de facteurs autres que la PrP elle-même qui conditionneraient la propagation de l'agent [28, 52, 53]. Dans l'avenir, les cultures cellulaires seront sans doute un outil essentiel pour la caractérisation et l'étude de ces facteurs.

### 4.3. Mécanismes de la neurodégénérescence et PrP<sup>Sc</sup>

Les mécanismes exacts de la neurodégénérescence dans les EST restent indéterminés, d'autant plus que la relation entre PrP<sup>Sc</sup> et neuropathologie a été remise en question à plusieurs reprises [54–56]. Afin de reproduire les mécanismes pathogènes des EST, des expériences de toxicité en culture cellulaire ont été réalisées avec des fragments peptidiques issus de la PrP.

Un peptide correspondant à la zone hydrophobe centrale de la PrP (codon 106–126 de la PrP humaine) s'est révélé toxique sur des neurones primaires en culture [57]. Ce peptide, qui a été ensuite utilisé dans plusieurs modèles *in vitro*, semble activer les cellules microgliales et astrocytaires et ainsi induire un stress oxydant [58, 59]. Parmi les hypothèses concernant l'effet de ce peptide nous citerons le fait qu'il semble capable de former des pores en s'intégrant dans les membranes biologiques [60].

En fait, l'une des premières surprises venue de l'étude des cultures cellulaires infectées par les prions a été l'absence d'un effet cytopathologique net lié à la multiplication de l'agent infectieux [23–25]. Certes les cellules PC12 semblaient avoir un phénotype légèrement altéré [61] et les cellules GT1–7 être légèrement plus apoptotiques après infection [27], mais ce n'est qu'avec le travail de Milhavel et al. [62] qu'il a été clairement démontré que l'infection altérait la réponse cellulaire au stress oxydant. Les cellules infectées présentaient notamment une altération de leur activité SOD ce qui n'est pas sans rappeler les résultats obtenus avec des cultures exprimant des quantités variables de PrP (voir paragraphe 3.2.). La relation entre la multiplication de l'agent et le stress oxydant pourrait concerner la fonction normale de la protéine dans le cadre du métabolisme des ions métalliques ou d'une voie de signalisation cellulaire.

Finalement, une forme trans-membranaire de la protéine PrP, appelée Ctm-PrP, a été identifiée et pourrait être le facteur pathogène des EST [55]. L'existence de ces formes trans-membranaires de la PrP a été décrite initialement dans des expériences de traduction *in vitro*, puis pour des PrP mutées notamment dans des EST d'origine génétique [63]. Il a été également découvert récemment un nouveau gène en aval de celui de la PrP. Ce gène code une protéine aux caractéristiques très proches de la PrP qui a été appelée Doppel. Cette protéine, sur-exprimée dans certaines lignées de souris PrP<sup>-/-</sup>, induit une neurodégénérescence des cellules de Purkinje [64]. Les cultures cellulaires permettront de définir avec plus de précision la biologie et le rôle de ces molécules dans les EST [65, 66].

## 5. Autres utilisations des cultures cellulaires infectées

### 5.1. Utilisation à des fins de recherche thérapeutique

Les cultures chroniquement infectées représentent un formidable outil pour cribler des substances susceptibles d'interférer avec la génération de PrP<sup>Sc</sup>. Les premières études réalisées dans les années 90, ont permis de montrer que le rouge Congo, ainsi que des dérivés des glycosaminoglycanes, avaient des activités anti-prions significatives [67, 68]. Depuis lors d'autres molécules ont montré en culture une capacité à diminuer la quantité de PrP<sup>Sc</sup> produite: des porphyrines [69], l'amphotéricine B [47], des dérivées du rouge Congo [70], des agents transfectants [71], des composés chimiques originaux [72], et enfin des molécules de PrP hétérologues et des peptides issus de la protéine [50, 51, 73]. Au delà de ces tests thérapeutiques, les mécanismes d'action de ces drogues ont également pu être déterminés grâce aux cultures cellulaires [42, 47, 74, 75].

### 5.2. Utilisation dans la détection de l'agent infectieux

Les lignées cellulaires sensibles aux prions représentent dans une certaine mesure une alternative aux

modèles animaux dans la détection de l'agent infectieux. Dans certains cas, la sensibilité des cultures aux prions est en effet très importante [53, 76]. Il est envisageable d'utiliser de tels modèles dans des buts de diagnostic pendant que ces modèles sont limités à certaines souches [10, 28, 52, 53] et il n'y a pas pour l'instant de lignées cellulaires sensibles à l'agent de l'ESB.

## 6. Conclusion

Les modèles en culture cellulaire des EST ont pris ces dernières années une place essentielle dans les recherches sur ces affections. Ils permettent en effet d'aborder de façon rapide et efficace les grandes questions qui restent en suspens concernant les prions. Parmi ces interrogations nous citerons: le rôle de la protéine normale, les étapes et les mécanismes de la conversion pathologique en PrP<sup>Sc</sup>, les paramètres influençant la transmission et la propagation des prions. Du point de vue de la recherche appliquée, les cultures représentent également des outils intéressants pour mettre en évidence de nouvelles molécules anti-prion et pour la détection et la caractérisation des différentes souches de prions.

## Références

- [1] Parchi P., Gambetti P., Human Prion Diseases, *Curr. Op. Neurol.* 8 (1995) 286–293.
- [2] Prusiner S.B., Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science* 216 (1982) 136–144.
- [3] Horiuchi M., Yamazaki N., Ikeda T., Ishiguro N., Shinagawa M., A cellular form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) exists in many non-neuronal tissues of sheep, *J. Gen. Virol.* 76 (1995) 2583–2587.
- [4] Caughey B., Race R.E., Chesebro B., Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines, *J. Gen. Virol.* 69 (1988) 711–716.
- [5] Scott M.R., Butler D.A., Bredesen D.E., Walchli M., Hsiao K.K., Prusiner S.B., Prion protein gene expression in cultured cells, *Protein Eng.* 2 (1988) 69–76.
- [6] Chesebro B., Wehrly K., Caughey B., Nishio J., Ernst D., Race R., Foreign PrP expression and scrapie infection in tissue culture cell lines, *Dev. Biol. Standard.* 80 (1993) 131–140.
- [7] Lehmann S., Harris D.A., A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24589–24597.
- [8] Petersen R.B., Parchi P., Richardson S.L., Urig C.B., Gambetti P., Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12661–12668.
- [9] Priola S.A., Caughey B., Wehrly K., Chesebro B., A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 3299–3305.
- [10] Vilette D., Andreoletti O., Archer F., Madelaine M.F., Vilotte J.L., Lehmann S., Laude H., Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 4055–4059.
- [11] Hsiao K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F., Terwilliger J.D., Westaway D., Ott J., Prusiner S.B., Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome, *Nature* 338 (1989) 342–345.
- [12] Daude N., Lehmann S., Harris D.A., Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11604–11612.
- [13] Lehmann S., Harris D.A., Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1633–1637.
- [14] Rosenmann H., Talmor G., Halimi M., Yanai A., Gabizon R., Meiner Z., Prion protein with an E200K mutation displays properties similar to those of the cellular isoform PrP<sup>C</sup>, *J. Neurochem.* 76 (2001) 1654–1662.
- [15] Priola S.A., Chesebro B., Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11980–11985.
- [16] Kaneko K., Vey M., Scott M., Pilkuhn S., Cohen F.E., Prusiner S.B., COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2333–2338.
- [17] Shyng S.L., Moulder K.L., Lesko A., Harris D.A., The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14793–14800.
- [18] Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C., Mice devoid of PrP are resistant to scrapie, *Cell* 73 (1993) 1339–1347.
- [19] Raeber A.J., Brandner S., Klein M.A., Benninger Y., Musahl C., Frigg R., Roeckl C., Fischer M.B., Weissmann C., Aguzzi A., Transgenic and knockout mice in research on prion diseases, *Brain Pathol.* 8 (1998) 715–733.
- [20] Hsiao K.K., Groth D., Scott M., Yang S.L., Serban H., Rapp D., Foster D., Torchia M., Dearmond S.J., Prusiner S.B., Serial transmission in

rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 9126–9130.

[21] Kuwahara C., Takeuchi A.M., Nishimura T., Haraguchi K., Kubo-saki A., Matsumoto Y., Saeki K., Matsumoto Y., Yokoyama T., Itoharu S., Onodera T., Prions prevent neuronal cell-line death, *Nature* 400 (1999) 225–226.

[22] Clarke M.C., Haig D.A., Evidence for the multiplication of scrapie agent in cell culture, *Nature* 225 (1970) 100–101.

[23] Rubenstein R., Carp R.I., Callahan S.M., In vitro replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells, *J. Gen. Virol.* 65 (1984) 2191–2198.

[24] Race R.E., Fadness L.H., Chesebro B., Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells, *J. Gen. Virol.* 68 (1987) 1391–1399.

[25] Butler D.A., Scott M.R., Bockman J.M., Borchelt D.R., Tarabou-los A., Hsiao K.K., Kingsbury D.T., Prusiner S.B., Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins, *J. Virol.* 62 (1988) 1558–1564.

[26] Meyer R.K., McKinley M.P., Bowman K.A., Braunfeld M.B., Barry R.A., Prusiner S.B., Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 2310–2314.

[27] Schatzl H.M., Laszlo L., Holtzman D.M., Tatzelt J., Dearmond S.J., Weiner R.I., Mobley W.C., Prusiner S.B., A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis, *J. Virol.* 71 (1997) 8821–8831.

[28] Nishida N., Harris D.A., Vilette D., Laude H., Frobert Y., Grassi J., Casanova D., Milhavet O., Lehmann S., Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein, *J. Virol.* 74 (2000) 320–325.

[29] Borchelt D.R., Rogers M., Stahl N., Telling G., Prusiner S.B., Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycosinoyl phospholipid anchor, *Glycobiol.* 3 (1993) 319–329.

[30] Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avrahami D., Laszlo L., Prusiner S.B., Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform, *J. Cell. Biol.* 129 (1995) 121–132.

[31] Gorodinsky A., Harris D.A., Glycolipid-anchored proteins in neuro-blastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin, *J. Cell. Biol.* 129 (1995) 619–627.

[32] Caughey B., Raymond G.J., Ernst D., Race R.E., N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state, *J. Virol.* 65 (1991) 6597–6603.

[33] Lehmann S., Milhavet O., Mange A., Trafficking of the cellular isoform of the prion protein, *Biomed. Pharmacother* 53 (1999) 39–46.

[34] Brown D.R., Besinger A., Prion protein expression and superoxide dismutase activity, *Biochem. J.* 334 (1998) 423–429.

[35] Brown D.R., Schmidt B., Kretschmar H.A., Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia, *J. Neurochem.* 70 (1998) 1686–1693.

[36] Brown D.R., Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper, *J. Neurosci. Res.* 58 (1999) 717–725.

[37] Brown D.R., Clive C., Haswell S.J., Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein, *J. Neurochem.* 76 (2001) 69–76.

[38] Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J.L., Lehmann S., Launay J.M., Kellermann O., Signal transduction through prion protein, *Science* 289 (2000) 1925–1928.

[39] Kurschner C., Morgan J.I., The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30 (1995) 165–168.

[40] Rieger R., Edenhofer F., Lasmezas C.I., Weiss S., The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells, *Nat. Med.* 3 (1997) 1383–1388.

[41] Caughey B., Brown K., Raymond G.J., Katzenstein G.E., Thresher W., Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red, *J. Virol.* 68 (1994) 2135–2141.

[42] Shyng S.L., Lehmann S., Moulder K.L., Harris D.A., Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 30221–30229.

[43] 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., Brentani R.R., Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritegenesis, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76 (2000) 85–92.

[44] Keshet G.I., Bar-Peled O., Yaffe D., Nudel U., Gabizon R., The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain, *J. Neurochem.* 75 (2000) 1889–1897.

[45] Taraboulos A., Serban D., Prusiner S.B., Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells, *J. Cell. Biol.* 110 (1990) 2117–2132.

[46] Naslavsky N., Stein R., Yanai A., Friedlander G., Taraboulos A., Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6324–6331.

[47] Mange A., Nishida N., Milhavet O., McMahon H.E.M., Casanova D., Lehmann S., Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures, *J. Virol.* 74 (2000) 3135–3140.

[48] Caughey B., Race R.E., Ernst D., Buchmeier M.J., Chesebro B., Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells, *J. Virol.* 63 (1989) 175–181.

[49] Taraboulos A., Raeber A.J., Borchelt D.R., Serban D., Prusiner S.B., Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 851–863.

[50] Priola S.A., Caughey B., Race R.E., Chesebro B., Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells, *J. Virol.* 68 (1994) 4873–4878.

[51] Kaneko K., Zulianello L., Scott M., Cooper C.M., Wallace A.C., James T.L., Cohen F.E., Prusiner S.B., Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 10069–10074.

[52] Rubenstein R., Deng H., Race R.E., Ju W., Scalici C.L., Papini M.C., Kascak R.J., Carp R.I., Demonstration of scrapie strain diversity in infected PC12 cells, *J. Gen. Virol.* 73 (1992) 3027–3031.

[53] Bosque P.J., Prusiner S.B., Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection, *J. Virol.* 74 (2000) 4377–4386.

[54] Lasmezas C.I., Deslys J.P., Robain O., Jaegly A., Beringue V., Peyrin J.M., Fournier J.G., Hauw J.J., Rossier J., Dormont D., Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein, *Science* 275 (1997) 402–405.

[55] Hegde R.S., Matrianni J.A., Scott M.R., DeFea K.A., Tremblay P., Torchia M., Dearmond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R., A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease, *Science* 279 (1998) 827–834.

[56] Chiesa R., Piccardo P., Ghetti B., Harris D.A., Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation, *Neuron* 21 (1998) 1339–1351.

[57] Forloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmons M., Bugiani O., Tagliavini F., Neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* 362 (1993) 543–546.

[58] Brown D.R., Schmidt B., Kretschmar H.A., Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* 380 (1996) 345–347.

[59] Forloni G., Del Bo R., Angeretti N., Chiesa R., Smioldo S., Doni R., Ghibaudi E., Salmons M., Porro M., Verga L., et al., A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy, *Eur. J. Neurosci.* 6 (1994) 1415–1422.

[60] Thellung S., Florio T., Villa V., Corsaro A., Arena S., Amico C., Robello M., Salmons M., Forloni G., Bugiani O., Tagliavini F., Schettini G., Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 299–309.

[61] Rubenstein R., Deng H., Scalici C.L., Papini M.C., Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells, *J. Gen. Virol.* 72 (1991) 1279–1285.

[62] Milhavet O., McMahon H.E., Rachidi W., Nishida N., Katamine S., Mange A., Arlotto M., Casanova D., Riondel J., Favier A., Lehmann S., Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 13937–13942.

[63] Hegde R.S., Tremblay P., Groth D., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R., Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration, *Nature* 402 (1999) 822–826.

[64] Moore R.C., Lee I.Y., Silverman G.L., Harrison P.M., Strome R., Heinrich C., Karunaratne A., Pasternak S.H., Chishti M.A., Liang Y., Mastrangelo P., Wang K., Smit A.F., Katamine S., Carlson G.A., Cohen F.E., Prusiner S.B., Melton D.W., Tremblay P., Hood L.E., Westaway D., Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 797–817.

- [65] Silverman G.L., Qin K., Moore R.C., Yang Y., Mastrangelo P., Tremblay P., Prusiner S.B., Cohen F.E., Westaway D., Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26834–26841.
- [66] Stewart R.S., Drisaldi B., Harris D.A., Transmembrane A., Form of the Prion Protein Contains an Uncleaved Signal Peptide and Is Retained in the Endoplasmic Reticulum, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 881–889.
- [67] Caughey B., Race R.E., Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red, *J. Neurochem.* 59 (1992) 768–771.
- [68] Caughey B., Raymond G.J., Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells, *J. Virol.* 67 (1993) 643–650.
- [69] Caughey W.S., Raymond L.D., Horiuchi M., Caughey B., Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12117–12122.
- [70] Rudyk H., Vasiljevic S., Hennion R.M., Birkett C.R., Hope J., Gilbert I.H., Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells, *J. Gen. Virol.* 81 (2000) 1155–1164.
- [71] Supattapone S., Nguyen H.O., Cohen F.E., Prusiner S.B., Scott M.R., Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14529–14534.
- [72] Perrier V., Wallace A.C., Kaneko K., Safar J., Prusiner S.B., Cohen F.E., Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 6073–6078.
- [73] Chabry J., Priola S.A., Wehrly K., Nishio J., Hope J., Chesebro B., Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence, *J. Virol.* 73 (1999) 6245–6250.
- [74] Caspi S., Halimi M., Yanai A., Sasson S.B., Taraboulos A., Gabizon R., The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3484–3489.
- [75] Mange A., Milhavel O., McMahon H.E., Casanova D., Lehmann S., Effect of amphotericin B on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells: putative mechanism of action in transmissible spongiform encephalopathies, *J. Neurochem.* 74 (2000) 754–762.
- [76] Lehmann S., Laude H., Harris D.A., Carp C., Vilette D., Katamine S., Madec J.Y., Nishida N., Ex vivo transmission of mouse adapted prion strains to N2a and GT1-7 cell lines, in : Jqbal K., Sisodia S.S., Wimblad B. (Eds.), *Alzheimers disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics*, John Wiley & Sons Ltd. UK, 2001, pp. 679–686.