

¹ Gamète Male et Fertilité, UMR 6073,
INRA-CNRS, Station de Physiologie de
la Reproduction et des Comportements,
F-37380 Monnaie

² Génétique Biochimique et
Cytogénétique, INRA, Domaine de
Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex

³ Unité de Biologie Cellulaire et
Moléculaire, INRA, Domaine de Vilvert,
F-78352 Jouy-en-Josas Cedex

⁴ UMR 1161, INRA-AFSSA-ENVA de
virologie, Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort, F-94704 Maisons-Alfort

Courriel : gatti@tours.inra.fr

Recherche d'un rôle physiologique pour la protéine prion cellulaire (PrPc)

Introduction

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) ou « maladies à prion » comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob humaine, l'encéphalopathie spongiforme bovine ou la tremblante (scrapie) du mouton sont caractérisées par la transformation post-traductionnelle d'une glycoprotéine cellulaire normale, la protéine prion (PrPc), en une protéine de conformation anormale, insoluble et relativement résistante aux protéases (PrPres) (Prusiner *et al* 1998). De nombreuses études ont été menées pour com-

prendre comment se produit cette transformation, et comment la PrPres ou la formation d'intermédiaire de transconformation, par leur accumulation au niveau du système nerveux central, induit les manifestations cliniques et les lésions caractéristiques de chacune de ces EST (Harris 1999, Malluci *et al* 2003). Cependant cette compréhension du ou des mécanismes aboutissant à la mort neuronale nécessite aussi la connaissance du rôle « normal » de la protéine prion dans la physiologie cellulaire, et celui-ci reste encore à élucider.

Résumé

De nombreuses études sont menées pour élucider le mécanisme de la transformation de la protéine prion normale (PrPc) en protéine pathogène résistante aux protéases (PrPres) et pour comprendre comment l'accumulation de cette PrPres peut induire les dégénérescences nerveuses observées lors des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST). Cependant, la protéine prion est une protéine ubiquitaire présente dans de nombreux tissus autres que le tissu nerveux et le rôle cellulaire « normal » joué par cette PrPc est très controversé et reste encore une énigme. Différentes équipes INRA utilisent leurs compétences en physiologie pour établir la présence et les voies de sécrétions de la protéine prion normale dans différents organes. Ces études se font en utilisant des modèles animaux et cellulaires classiques, mais aussi des souris où le gène codant pour la protéine prion est supprimé (PrP^{-/-}) ou sa quantité sur-exprimée par introduction de multiples copies de ce gène. Ceci permettra d'une part d'étudier le ou les rôles possibles de cette protéine dans les différents tissus et fluides biologiques (protection contre le stress oxydatif, transport de métaux, signalisation cellulaire, etc.), d'autre part de rechercher si lors de l'infection, de la protéine prion pathogène est retrouvée dans certains de ces fluides biologiques tels que le lait et le sperme. En effet, si les études passées n'ont jamais montré de protéine prion pathogène dans ces fluides, des travaux utilisant des méthodes plus sensibles sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Différentes fonctions ont été suggérées pour la protéine prion. Elle peut lier et transporter certains métaux comme le cuivre, le zinc, le manganèse et pourrait activer ou avoir elle-même une activité superoxyde dismutase (SOD) (Brown *et al* 1999, 2000, Waggoner *et al* 2000, Vassalo et Herms 2003) ; ceci veut dire qu'elle pourrait donc intervenir dans le transport des métaux au niveau de la membrane des cellules et aussi dans le contrôle du stress oxydatif, un des principaux facteurs de l'altération des membranes cellulaires capable de déclencher l'apoptose, c'est-à-dire la mort de la cellule. Cette activité a été reliée à un rôle anti-apoptotique de la protéine prion normale (passant peut-être par la signalisation cellulaire via l'activation de kinase (Mouillet-Richard *et al* 2000)). Cependant ce rôle ne semble pas faire l'unanimité et d'autres fonctions ont été décrites comme celle de chaperone, protéine impliquée dans le repliement des protéines naissantes. Ce rôle pourrait être similaire à celui des protéines de l'enveloppe des rétrovirus qui interviennent aussi dans la réplication

d'acides nucléiques en se liant à eux de façon spécifique (Derrington *et al* 2002). Enfin il a été décrit la possibilité pour des fragments de PrPc de s'auto-assembler pour former des structures membranaires semblables à des canaux permettant peut-être des échanges ioniques (Bahadi *et al* 2003).

Une approche utilisée pour comprendre le rôle de la protéine prion est l'obtention de modèles murins ou cellulaires, soit qui, après l'introduction de multiples copies de son gène dans le génome hôte, sur-expriment cette protéine, de sorte qu'elle est fabriquée en grande quantité, soit qui n'ont plus la protéine, après inactivation de son gène. En fait, l'absence de la protéine prion, induite par l'ablation du gène *Prnp* chez la souris (souris *PrP^{-/-}*), ou sa surexpression n'engendrent pas de phénotype particulier, c'est-à-dire de conséquences physiologiques visibles. Ce manque d'effet pourrait s'expliquer en partie par l'existence de mécanismes de compensation à l'absence de la protéine prion normale. Par exemple, il existe une protéine, la protéine Doppel, dont le gène proviendrait d'une duplication du gène codant pour la protéine prion (Moore *et al* 1999). Cette protéine possède une certaine homologie de séquence avec la protéine prion (Makinou *et al* 2002), et elle semble capable de lier le cuivre (Quin *et al* 2003). Grâce à cette propriété, la protéine Doppel pourrait peut-être relayer certaines des fonctions de la protéine prion. Malgré l'absence de modifications physiologiques visibles, ces modèles de souris transgéniques restent néanmoins intéressants pour comparer leur réponse à des stress physiologiques induits pour rechercher le rôle normal de la PrPc.

Une des caractéristiques communes aux EST est leur transmissibilité, y compris pour les formes dites sporadiques ou familiales. Cette transmissibilité est démontrée par les contaminations iatrogènes humaines (greffes de dure-mère ou de cornée, injection d'hormone de croissance), dans le cas de l'épidémie d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) ainsi que dans de nombreux modèles d'infections expérimentales de primates ou d'animaux de laboratoire. Il est montré expérimentalement (et aussi naturellement dans le cas du kuru lors de rituels cannibales) que l'ingestion de l'agent infectieux peut entraîner l'apparition de la maladie de même que son injection dans le cerveau ou dans des tissus autres que ceux du système nerveux central (Maignien *et al* 1999, Race *et al* 2000). Cependant dans les conditions naturelles les modalités de l'infection restent encore mal comprises, en particulier chez les ovins. La transmission mère-fœtus est une piste privilégiée (Andréoletti *et al* 2002) mais qui n'explique pas tous les cas observés. L'étude de la protéine prion normale permet aussi d'analyser certaines voies de transmission possibles de ces EST.

La PrPc dans différents tissus

La protéine prion normale est présente partout dans l'organisme. Ce paragraphe n'abor-

de que les localisations préférentielles et importantes, nécessaires pour adresser les questions posées précédemment.

1 / le tractus génital mâle

L'ARNm de la protéine PrPc a été mis en évidence au niveau testiculaire et la protéine prion cellulaire (PrPc) a été trouvée sur la membrane des spermatozoïdes chez l'homme et chez différents autres mammifères (Tanji *et al* 1995, Shaked *et al* 1999, Peoc'h *et al* 2002). De façon intéressante, la protéine homologue Doppel est elle aussi exprimée fortement au niveau testiculaire et semble présente au niveau des spermatozoïdes (Silverman *et al* 2000, Tranulis *et al* 2001, Peoc'h *et al* 2002). L'absence de la protéine PrPc chez la souris ne semble pas avoir d'effet important sur la reproduction alors que les souris dont le gène Doppel est invalidé présentent une stérilité non expliquée (Behrens *et al* 2002).

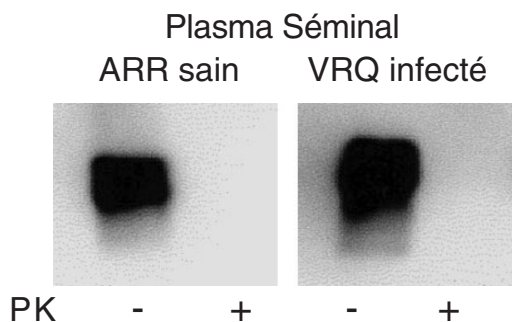
Les résultats obtenus à l'INRA de Nouzilly montrent que la protéine PrPc est présente sur la membrane des spermatozoïdes de bélier et, de façon inattendue, en quantité bien plus importante dans les fluides séminaux que sur les spermatozoïdes (Gatti *et al* 2002). Cette protéine PrPc soluble semble provenir en grande partie d'une sécrétion par l'épididyme, organe post-testiculaire nécessaire à l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'étude de la protéine prion normale présente dans les fluides séminaux et les spermatozoïdes chez des béliers sains et des béliers atteints de tremblante a montré qu'il n'y avait pas de différence visible entre ces deux états. Enfin, il n'a pas été trouvé de protéine prion pathologique PrPres dans les fluides séminaux des animaux malades. En effet, la protéine prion obtenue à partir de plasmas séminaux d'animaux de génotype résistant et d'animaux malades a été traitée à la protéinase K et aucune PrPres n'a pu être mise en évidence par la technique de western-blot (figure 1).

Malgré ce résultat négatif, il est nécessaire de réévaluer le risque que les maladies à prion puissent être transmises sexuellement. En effet, l'absence de PrPres dans un tissu peut être due à la combinaison d'une quantité très faible et de la limite de détection des techniques employées. De plus, aucune des études réalisées sur la possible transmission de tremblante par le sperme ne peut conclure avec certitude à l'absence de transmission (Wrathall 1997). En effet, elles ont été réalisées soit par injection de semence sur des moutons avant la découverte du polymorphisme de résistance et avec des suivis inférieurs à 30 mois, soit à des souris avec le problème de barrière d'espèce et de temps d'incubation que cela pose pour la tremblante (Hourrigan *et al* 1979, Palmer 1959, Detwiler et Baylis 2003). Une expérimentation est donc en cours à l'INRA pour réévaluer ce risque ; elle utilise la possibilité offerte par la mise au point des modèles murins transgéniques sur-exprimant la protéine prion ovine.

Ces souris ont été fabriquées par l'équipe de J.-L. Vilotte au laboratoire de l'INRA de Jouy-

Figure 1. La protéine prion de plasma séminaux d'animaux sains de génotype ARR/ARR (génotype résistant) et infectés de génotype VRQ/VRQ (génotype sensible, animal infecté) est immunoprécipitée puis traitée par la protéinase K (+). Après traitement, la protéine témoin (-) et la protéine traitée sont séparées sur gel d'électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées avec un anticorps monoclonal spécifique.

L'immuno-empreinte montre qu'il n'y a pas de protéine prion résistante à la protéinase K dans le plasma séminal d'animaux atteints de tremblante.



en-Josas en insérant dans le génome de souris *PrP*^{-/-} un grand nombre de copies du gène de l'allèle sensible (VRQ) de la PrP ovine (Laude *et al* 2002). L'utilisation de ces souris permet de s'affranchir en partie de la barrière d'espèce et d'augmenter la sensibilité à la maladie tout en diminuant très fortement la durée d'incubation.

En plus des souris qui surexpriment la protéine prion de mouton, cette équipe a aussi créé plusieurs autres modèles de souris qui surexpriment la protéine prion de souris et de bovin. Les souris transgéniques murines expriment la protéine prion en très grande quantité dans les différents tissus alors que de façon surprenante les souris transgéniques bovines l'expriment presque exclusivement au niveau du testicule (Mata *et al* 2003). Dans ces différents modèles, les cellules germinales et les spermatozoïdes présentent des quantités très importantes de protéine prion par rapport à des souris normales. Ces différents types de souris, qui sont fertiles, pourraient devenir un bon modèle pour l'analyse du rôle de la PrPc dans les gamètes. En effet, le rôle exact de la protéine prion normale PrPc dans la physiologie du tractus génital mâle et des spermatozoïdes reste à établir. Les spermatozoïdes de souris *PrP*^{-/-} semblent plus sensibles à des stress oxydatifs que ceux des spermatozoïdes témoins (Shaked *et al* 1999). Ce rôle de protection va dans le sens de la fonction supposée pour cette protéine, de superoxyde dismutase. Cependant, ces résultats sont à confirmer.

2 / La glande mammaire

Dans les pays développés, 30 % des protéines animales consommées sont issues du lait. La lactation est l'étape finale d'une suite de transformations de la glande au cours des

périodes de puberté et de gestation. L'épithélium mammaire s'organise pour former les lobules alvéolaires où les cellules se différencient et acquièrent la capacité de synthétiser et de sécréter les constituants du lait. Au niveau de cette glande, ce sont les cellules épithéliales qui sont le siège de l'activité sécrétoire de nombreux constituants du lait bien que certains composés proviennent du sang et transitent par ces cellules (transcytose) (Ollivier-Bousquet 2002). La glande mammaire a plusieurs rôles, elle assure la nutrition mais aussi la protection immunitaire du nouveau-né en transférant des immunoglobulines depuis le sang mais aussi des lymphocytes T qui s'accumulent dans la mamelle lors de la lactation.

A ce jour, les différentes études menées pour rechercher l'infectiosité dans le lait d'animaux atteints d'EST ont conclu à l'innocuité de ce fluide biologique (Detwiller et Baylis 2003). Toutefois ces études restent limitées par la quantité de produit injectable dans le cas de test chez la souris ou de produit disponible pour des expériences de transmission par ingestion.

Les connaissances sur la présence et le rôle de la protéine prion dans la glande mammaire sont très limitées. Différentes équipes INRA de Jouy-en-Josas ont associé leurs compétences pour explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui impliquent la protéine prion dans la glande mammaire, en particulier suivre l'activation du gène *Prnp* et la localisation tissulaire de cette protéine au cours du cycle mammaire. Cette étude s'effectue sur la souris pour avoir accès aux modèles transgéniques (*PrP*^{-/-} ou qui surexpriment la PrPc) et sur la brebis pour comparer des animaux sains à ceux atteints de tremblante.

Les premiers résultats obtenus montrent que le gène *Prnp* est transcrit au niveau de la glande mammaire et qu'il donne naissance à deux ARN messagers de différentes tailles (4,6 et 2,1 KB). Les ARN messagers sont détectables dès les phases précoces du développement de la glande et tendent à diminuer au cours de la différenciation cellulaire. L'évolution de l'expression de la protéine prion normale est concomitante de celle des ARN messagers, à l'exception de la période de lactation où la protéine tend à s'accumuler. La protéine prion normale est localisée principalement dans les cellules épithéliales et myo-épithéliales et au niveau des membranes basolatérales des cellules sécrétrices (figure 2). Chez les deux espèces étudiées (murin et ovin), l'expression de la protéine fluctue au cours du cycle mammaire et présente un maximum lors de la phase la plus intense d'expansion des acini qui a lieu lors du dernier tiers de la gestation. Une étude similaire est en cours avec des brebis atteintes de tremblante pour chercher si des perturbations dans cette localisation ont lieu. Des études sont entreprises aussi pour savoir si la protéine prion normale est sécrétée dans le lait de façon naturelle et si c'est le cas, il sera important de rechercher dans quelle fraction du lait elle se retrouve et si elle s'associe à certaines protéines spécifiques. Ceci

servira ensuite à déterminer de façon beaucoup plus ciblée (et sensible) si, au cours de l'infection, de la protéine prion transconformée (PrPres) pourrait être sécrétée par les mêmes voies.

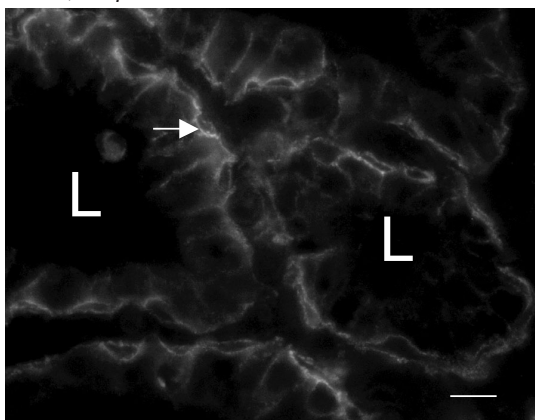
3 / Les cellules intestinales

Diverses études montrent que lors d'une infection dans les conditions naturelles ou expérimentales par l'agent de la tremblante, la PrPres s'accumule dans le Système Nerveux Central (SNC) et dans d'autres tissus dont le tractus digestif (Andréoletti *et al* 2002, Heggebo *et al* 2002). Un passage par voie orale est impliqué dans la transmission de l'ESB aux bovins et suspecté chez l'homme dans la transmission du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jacob. A l'heure actuelle, la localisation exacte et les différentes étapes du franchissement de la barrière épithéliale intestinale par les Agents Transmissibles Non-Conventionnels (ATNC) comme le prion après absorption par voie orale restent inconnues. Une hypothèse est que le passage de la barrière intestinale se produit à travers l'épithélium digestif surmontant les plaques de Peyer (FAE : Follicle Associated Epithelium), formations lymphoïdes de l'intestin grêle, et comportant des cellules (dites cellules M), spécialisées dans le passage sans dégradation des agents pathogènes (Heppner *et al* 2001).

Afin de préciser les mécanismes permettant le passage des ATNC à travers la barrière épithéliale intestinale, une équipe associée INRA-AFSSA-ENVA étudie l'expression de la PrPc dans le FAE et dans les plaques de Peyer ainsi que le rôle possible de la PrPc comme récepteur aux ATNC.

Les premières études *in vitro* montrent que la PrPc est faiblement exprimée dans la lignée cellulaire d'entérocytes humains

Figure 2. Localisation de la protéine prion normale dans les cellules épithéliales mammaires de brebis au 30ème jour de la lactation. Les tissus sont fixés et traités pour l'immunofluorescence par un anticorps monoclonal anti protéine prion ovine. La protéine prion est détectable à proximité des membranes basolatérales des cellules épithéliales et des membranes des cellules myoépithéliales (flèche). L, lumière des acinus. Barre, 20 µm.



(Caco2), et que la surexpression de la PrPc peut être réalisée dans cette lignée après l'infection par un adénovirus (transfection) exprimant la PrP humaine. *In vivo*, il est possible de contaminer avec un adénovirus les plaques de Peyer chez la souris, mais l'efficacité est faible notamment dans le FAE. D'autres approches devront être évaluées pour surexprimer la PrPc au niveau intestinal afin de mesurer une modification du passage intestinal des ATNC.

4 / les cellules neuronales

La PrPc est une protéine fortement exprimée dans les cellules neuronales. Un rôle anti-apoptotique pour cette protéine a été suggéré *in vitro*, mais aucune donnée *in vivo* n'est venue corroborer ces résultats. Pour évaluer le rôle physiologique de la PrPc dans les mécanismes de survie neuronale, l'équipe INRA-AFSSA utilise des modèles de mort neuronale *in vitro* et *in vivo*.

a / Modèle *in vivo*

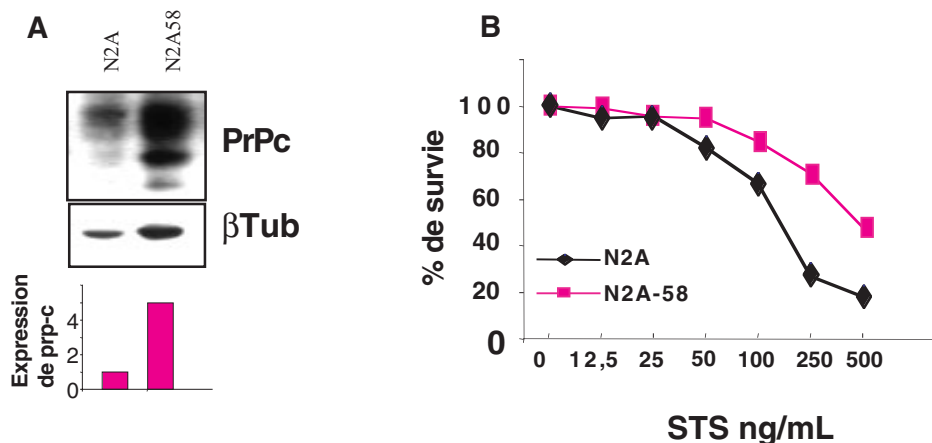
De façon à évaluer son rôle *in vivo*, l'équipe utilise un modèle de mort neuronale induite par section du nerf à la naissance avec des souris soit sur-exprimant la PrPc, soit dont le gène a été supprimé (*PrP*^{-/-}). La section du nerf facial chez les souriceaux témoins âgés de 2 et 7 jours entraîne, quatre jours après la section, une perte neuronale massive par apoptose. Les résultats montrent que la surexpression de PrPc protège 25 à 30 % des motoneurons, indiquant *in vivo* un rôle anti-apoptotique de la PrPc. Au contraire, la même expérience chez des souriceaux *PrP*^{-/-} ne conduit pas à une mort neuronale supérieure à celle observée chez les souris contrôles, suggérant soit des mécanismes compensatoires soit que la protéine PrPc ne joue pas de rôle physiologique dans ce modèle de mort moto-neuronale.

b / Modèle *in vitro*

Une transfection stable du gène codant pour la PrPc murine a permis d'obtenir un taux 5 fois plus élevé de la protéine dans les cellules de neuroblastome murin (Neuro2A). Lorsqu'on soumet ces cellules Neuro2A à un traitement par la staurosporine (STS), celles-ci meurent dans un processus apoptotique (figure 3A). A toutes les doses étudiées, les Neuro2A qui surexpriment la protéine PrPc apparaissent plus résistantes au traitement que les cellules Neuro2A témoins : de 18 à 44 % de cellules supplémentaires sont en effet présentes pour des doses de 100 à 250 nM de STS (figure 3B). La même expérience a été menée avec les cellules de neuroblastome humain (SH-SY-5Y). Ces cellules ont été transfectées par un adénovirus recombinant codant pour le gène de la PrPc humaine qui permet sa surexpression. Le taux d'apoptose produit par 100 nM de staurosporine est diminué de moitié lorsque les cellules surexpriment la PrPc.

Dans ces différents modèles cellulaires, la surexpression de la PrPc est corrélée avec

Figure 3. Expression de la protéine prion normale Prp dans les cellules N2a après transfection (N2A-58) et comparaison de la survie des cellules transfectées et normales en fonction de la dose de staurosporine (STS) (voir texte).



une augmentation de la survie des neurones, ce qui suggère fortement un rôle anti-apoptotique pour la protéine. Ces résultats favorisent l'hypothèse selon laquelle une altération du rôle physiologique de la protéine pourrait être responsable, tout du moins en partie et dans des conditions de stress qui restent à définir, de la mort des neurones observée dans le cas des EST.

Conclusions et Perspectives

Ces premiers travaux montrent que différents types d'épithélium sont capables de synthétiser et de sécréter la protéine prion. Ces propriétés pourraient jouer un rôle facilitateur pour la pénétration de la forme pathogène mais aussi pour sa dissémination. Néanmoins la présence de la protéine prion pathogène (PrPres ou PrP infectieuse) n'a pour l'instant pas été démontrée ni dans le lait ni dans le plasma séminal. La présence de grande quantité de protéine prion normale (PrPc) dans le plasma séminal permet d'envisager un rôle de cette protéine dans la survie des gamètes, qui pourrait s'apparenter à son effet protecteur sur les neurones en condition de stress. De même, à partir de ces fluides, il pourrait être possible de déterminer si des partenaires protéiques interviennent pour solubiliser et permettre le transport dans l'organisme de cette protéine hydrophobe et

ainsi mieux analyser les différentes étapes de son cheminement lors de l'infection. L'utilisation de ces différents systèmes biologiques *in vivo* et *in vitro* montre la complexité de la physiologie de la protéine prion et la nécessité de nombreuses approches complémentaires pour en avoir une meilleure compréhension.

Remerciements

Ces travaux sont soutenus par des financements provenant du Groupement d'Intérêt Scientifique Prion (programme national de recherche sur les infections à prions) et de soutien spécifique de l'INRA (AIP).

Cet article est tiré des présentations faites au cours du 3^e séminaire sur les recherches à l'INRA engagées sur les EST et les prions par :

- 1) Gatti J.L., Dacheux J.L., Sarradin P., Lantier F. (INRA Nouzilly), Moudjou M. (INRA Jouy-en-Josas), Andréoletti O. (ENV-INRA Toulouse)
- 2) Mata X., Besnard N., Tilly G., LeRoux K., Hudrisier M., Costa Da Silva J., Laude H., Vilotte J.L. (INRA Jouy-en-Josas).
- 3) Grosclaude J. *et al*, Ollivier-Bousquet M. *et al*, Djiane J. *et al*, (INRA Jouy-en-Josas), Dupont D. *et al* (TPA Poligny).
- 4) Couplier M., Arrabal S., Kacem K., Cordonnier N., Monteil M., Mercier S., Eloit M. (INRA-AFSSA-ENVA de virologie).

Références

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

Bahadi R., Farrelly P.V., Kenna B.L., Kourie J.I., Tagliavini F., Forloni G., Salmons M., 2003. Channels formed with a mutant prion protein PrP(82-146) homologous to a 7-kDa fragment in diseased brain of GSS patients. *American Journal of Physiology (Cell Physiology)*, 285, C862-872.

Behrens A., Genoud N., Naumann H., Rulicke T., Janett F., Heppner F.L., Ledermann B., Aguzzi A., 2002. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO Journal*, 21, 3652-3658.

Brown D.R., Wong B.S., Hafiz F., Clive C., Haswell S.J., Jones I.M., 1999. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 344, 1-5.

Brown D.R., Hafiz F., Glasssmith L.L., Wong B.S., Jones I.M., Clive C., Haswell S.J., 2000. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO Journal*, 19, 1180-1186.

Derrington E., Gabus C., Leblanc P., Chnaidermann J., Grave L., Dormont D., Swietnicki W., Morillas M., Marc D., Nandi P., Darlix J.-L., 2002. PrP has nucleic acid chaperone properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1. *Comptes Rendus Biologies*, 325, 17-23.

Detwiller L.A., Baylis M., 2003. The epidemiology of scrapie. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International d'Epizootie*, 22, 121-143.

- Gatti J.L., Metayer S., Moudjou M., Andreoletti O., Lantier F., Dacheux J.L., Sarradin P., 2002. Prion protein is secreted in soluble forms in the epididymal fluid and proteolytically processed and transported in seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 67, 393-400.
- Harris D.A., 1999. Cellular biology of prion diseases. *Clinical and Microbial Reviews*, 12, 429-444.
- Heggebo R., Press C.M., Gunnes G., Gonzalez L., Jeffrey M., 2002. Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology*, 83, 479-489.
- Heppner F.L., Christ A.D., Klein M.A., Prinz M., Fried M., Kraehenbuhl J.P., Aguzzi A., 2001. Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine*, 7, 976-977.
- Hourigan J., Klingsporn A., Clark W.W., de Camp M., 1979. Epidemiology of scrapie in the United States. In *Slow transmissible diseases of the nervous system*, vol. 1, Academic Press Inc., New York, pp. 331-356.
- Laude H., Vilette D., Le Dur A., Archer F., Soulier S., Besnard N., Essalmani R., Vilotte J.L., 2002. New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies*, 325, 49-57.
- Maignien T., Lasmezas C., Beringue V., Dormont D., Deslys J.P., 1999. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Journal of General Virology*, 80, 3035-3042.
- Makinou E., Collinge J., Antoniou M., 2002. Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mammalian Genome*, 13, 696-703.
- Mallucci G., Dickinson A., Linehan J., Klohn P.-C., Brandner S., Collinge J., 2003. Depleting Neuronal PrP in Prion Infection Prevents Disease and Reverses Spongiosis. *Science*, 302, 871-874.
- Mata X., Besnard N., Le Roux K., Tilly G., Andreoletti O., Hudrisier M., Costa Da Silva J., Laude H., Vilotte J.L., 2003. Unexpected high testis-specific transcriptional activity of the cyclin T1 promoter in transgenic mice. *FEBS Letters*, 549, 163-166.
- 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., 1999. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of Molecular Biology*, 292, 797-817.
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J.L., Lehmann S., Launay J.M., Kellermann O., 2000. Signal transduction through prion protein. *Science*, 289, 1925-1928.
- Ollivier-Bousquet M., 2002. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reproduction Nutrition Developpement*, 42, 149-162.
- Palmer A.C., 1959. Attempt to transmit scrapie by injection of semen from an affected ram. *The Veterinary Record*, 71, 664.
- Peoc'h K., Serres C., Frobert Y., Martin C., Lehmann S., Chasseigneaux S., Sazdovitch V., Grassi J., Jouannet P., Launay J.M., Laplanche J.L., 2002. The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 43071-43078.
- Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S., Cohen F.E., 1998. Prion protein biology. *Cell*, 93, 337-348.
- Qin K., Coomaraswamy J., Mastrangelo P., Yang Y., Lugowski S., Petromilli C., Prusiner S.B., Fraser P.E., Goldberg J.M., Chakrabarty A., Westaway D., 2003. The PrP-like protein Doppel binds copper. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 8888-8896.
- Race R., Oldstone M., Chesebro B., 2000. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *Journal of Virology*, 74, 828-833.
- Shaked Y., Rosenmann H., Talmor G., Gabizon R., 1999. A C-terminal-truncated PrP isoform is present in mature sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 32153-32158.
- Silverman G.L., Qin K., Moore R.C., Yang Y., Mastrangelo P., Tremblay P., Prusiner S.B., Cohen F.E., Westaway D., 2000. Doppel is an N-glycosylated, glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26834-26841.
- Tanji K., Saeki K., Matsumoto Y., Takeda M., Hirasawa K., Doi K., Matsumoto Y., Onodera T., 1995. Analysis of PrPc mRNA by in situ hybridization in brain, placenta, uterus and testis of rats. *Intervirology*, 38, 309-315.
- Tranulis M.A., Espenes A., Comincini S., Skretting G., Harbitz I., 2001. The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression. *Mammalian Genomes*, 12, 376-379.
- Vassalo N., Herms J., 2003. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *Journal of Neurochemistry*, 86, 538-544.
- Waggoner D.J., Drisaldi B., Bartnikas T.B., Casareno R.L., Prohaska J.R., Gitlin J.D., Harris D.A., 2000. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7455-7458.
- Wrathall A.E., 1997. Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos. *Revue des Sciences et Techniques*, 16, 240-264.

Abstract

The physiological role of the PrP protein in normal tissues and fluids

Numerous studies have been done to understand how a normal prion protein (PrPc) can be transformed into a protein resistant to proteases (PrPres) that, when accumulated in the central nervous system, induces the characteristic alterations of the Prion diseases. However much less attention has been given to unders-

tanding the normal cellular role played by this ubiquitous protein found in almost all tissues. Several INRA laboratories have begun to analyse the physiological role of the PrP protein in normal tissues and fluids using different models of healthy and infected animals, and also animals and cells with or without expression of the PrP protein. These studies also address the question whether some of the body fluid could also be potentially implicated in the spreading of prion diseases.