

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**La protéine prion cytoplasmique induit la formation d'une structure
ribonucléoprotéique très semblable au corps chromatoïde.**

Par

Simon Beaudoin

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade

Maître ès Sciences (M.Sc.) en biochimie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-63011-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-63011-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

La protéine prion cellulaire (PrP^C) est une protéine majoritairement membranaire exprimée constitutivement. Ses fonctions demeurent encore nébuleuses: elle serait impliquée dans l'homéostasie du cuivre, le système immunitaire, la neuroprotection et la différenciation cellulaire. Des études montrent que PrP^C est aussi présente dans le cytoplasme des cellules, mais aucun rôle ne lui est encore attribué. De plus, d'autres études suggèrent que la présence d'agrégats cytoplasmiques de PrP^C en condition pathologique, par exemple lors d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs), pourrait être la cause de la neurodégénérescence. Les ESTs sont des maladies neurodégénératives infectieuses. Chez l'humain, la plus répandue est la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Chez les animaux, la plus importante est la maladie de la vache folle puisqu'elle est la seule transmissible à l'homme et qu'elle a eu un impact néfaste pour l'économie.

Auparavant, nous avons proposé que la toxicité des agrégats cytoplasmiques de PrP^C, aussi nommés agrésome de PrP^C, pourrait être expliquée par une réponse au stress inadéquate. De plus, nous avons montré que l'agrésome de PrP^C est une particule ribonucléoprotéique (RNP) d'ARNs poly(A). Nous avons émis l'hypothèse que les deux phénomènes d'agrégation, soit l'agrégation de PrP^C et des ARNs poly(A), sont interdépendants. Cependant, nos résultats démontrent que l'agrégation de PrP^C n'est pas nécessaire pour induire l'agrégation des ARNs. Le domaine responsable de l'agrégation des ARN poly(A) est le domaine N-terminal non structuré de PrP^C alors que la région C-terminale est responsable de l'agrégation protéique. Nous avons donc suggéré que dans le cytoplasme, PrP^C induit la formation d'une particule RNP très complexe ressemblant à un agrésome d'ARN. Nos résultats démontrent non seulement que cette particule RNP possède les mêmes caractéristiques cellulaires que les

agrégomes protéiques mais aussi qu'elle possède une composition très similaire au corps chromatoïde.

Le corps chromatoïde est une particule RNP qu'on retrouve à différentes étapes de la spermatogenèse ainsi qu'au niveau des cellules souches et des néoblastes de vers planaires. Son rôle demeure encore incertain, cependant plusieurs études suggèrent que le corps chromatoïde aurait un rôle dans la régulation et la maturation des ARNm à cause de son contenu en protéines et ARNs. Par exemple, il est constitué de plusieurs types d'ARN dont les ARNm, l'ARNr 5S, le petit ARN U1, les ARNt et les micro-ARN. Au niveau protéique, il est composé entre autre de la protéine Dicer impliquée dans la biogenèse des micro-ARN, de l'enzyme de décoiffage Dcp1a, des protéines Sm impliquées dans l'épissage alternatif des ARNm, des Dead-box ARN hélicases DDX6 et MVH et enfin des nucléoporines composants les pores nucléaires. Nous avons proposé que cette particule RNP, induite par PrP^C dans le cytoplasme, pourrait avoir un rôle physiologique et/ou pathologique dans la régulation et la maturation des ARNm.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures.....	x
1. Introduction.....	1
1.1. Généralités sur la protéine prion (PrP ^C).....	1
1.1.1. Le gène <i>PRNP</i>	1
1.1.2. Structure de PrP ^C	2
1.1.3. Le trafic intracellulaire de PrP ^C est complexe.....	3
1.1.4. Rôles physiologiques de PrP ^C	5
1.2. Les maladies à prion et les formes pathologiques de PrP ^C	9
1.2.1. Pathologie des maladies à prion.....	9
1.2.2. Les trois formes des maladies à prion.....	9
1.2.3. La protéine prion scrapie, PrP ^{Sc}	12
1.2.4. La protéine prion cytoplasmique, CyPrP.....	13
1.3. La protéine prion et les acides nucléiques.....	17
1.3.1. Interaction entre PrP ^C , PrP ^{Sc} et les acides nucléiques.....	17
1.4. Les granules d'ARNs.....	20
1.4.1. Granules de stress.....	20
1.4.2. Processing bodies (P-Bodies).....	24
1.4.3. Corps chromatoïdes.....	28

1.5. Problématique et hypothèses de recherche.....	34
1.5.1. Énoncé de la problématique.....	34
1.5.2. Hypothèses et buts.....	35
2. Résultats.....	35
2.1. Avant-propos.....	35
2.2. Article : A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body, an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation.....	36
2.3. Matériel et méthodes supplémentaires.....	73
2.3.1. Cytométrie sur lame.....	73
2.4. Résultats supplémentaires.....	73
2.4.1. Modification du métabolisme des ARN poly(A).....	73
2.4.2. L'expression de PrP au niveau de la spermatogonie.....	78
3. Discussion.....	79
3.1. Une nouvelle particule RNP induite par PrP et sa similarité avec le corps chromatöide.....	79

3.2. Implication de PrP dans l'agrégation des ARNs et rôles physiologiques.....	83
3.3. Rôles pathologiques possibles de la particule PrP-RNP.....	88
3.4. Conclusion et perspectives.....	91
4. Remerciements.....	93
5. Références.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
Bax	Protéine associée à Bcl-2
BSE	Encéphalopathie spongiforme bovine
CBs	Corps chromatoïde
CPEBP-1	Protéine liant les éléments de polyadénylation cytoplasmique 1
C tm PrP	Protéine prion transmembranaire avec domaine C-terminal cytoplasmique
CWD	Maladie débilitante chronique des cervidés
CyPrP	Protéine prion cytoplasmique
CyPrP ^{EGFP}	Protéine prion cytoplasmique étiquetée avec EGFP
Dcp	Protéine de décoiffage (decapping enzyme)
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
EGFP	Protéine fluorescente verte intensifiée
eIF	Facteur d'initiation de la traduction eucaryote
ERAD	Dégradation associée au réticulum endoplasmique
ESTs	Encéphalopathies spongiformes transmissibles
fCJD	Creutzfeldt-Jakob familiale
FFI	Insomnie fatale familiale
FMRP	Protéine du retard mental du X fragile
G3BP	Ribonucléase liant Ras-GAP
GCN2	Protéine de contrôle du glucose non répressible 2
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
G-quartet	Guanine quartet
GS	Granules de stress
GSS	Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HRI	Kinase inhibitrice régulée par l'hème
Hsp	Protéine « heat shock »

HuR	Antigène R humain
AIF	Facteur induisant l'apoptose (apoptosis inducing factor)
Kb	Kilobases
KO	Knockout
ARNr	ARN ribosomique
mi-ARN	Micro-ARN
MTOC	Centre organisationnel des microtubules
MVB	Multivesicular bodies
MVH	Mouse Vasa homolog
NCp7	Protéine de la nucléocapside 7
NMD	Voie de dégradation des ARNs non-sens
NRAGE	Neurotrophin receptor interacting MAGE homolog
N tm PrP	Protéine prion transmembranaire avec domaine N-terminal cytoplasmique
ORF	Cadre de lecture ouvert
PABP-1	Protéine liant les polyadényl 1
pb	paire de base
P-Bodies	Processing bodies
PERK	Protéine kinase du réticulum endoplasmique apparentée à PKR
PKR	Protéine kinase activée par les ARNs double-brins
poly(A)	polyadénylé
PP1c	Protéine phosphatase 1
PrP	protéine prion
PrP ^C	Protéine prion cellulaire
PrP ^{res}	Protéine prion résistante à la protéinase K
PrP-RNP	Ribonucléoprotéique induite par PrP
PrP ^{Sc}	Protéine prion scrapie
PrP ^{sen}	Protéine prion sensible à la protéinase K
RE	Réticulum endoplasmique
RISC	RNA-induced silencing complex
RNase	Ribonucléase
RNP	ribonucléoprotéique
ROS	Espèce d'oxygène réactive
SCA3	Ataxie spinocérébrale de type 3
sCJD	Creutzfeldt-Jakob sporadique

SELEX	Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
Sm	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins
SMA	Atrophie musculaire spinale
SMN	Protéine de survie des neurones moteurs
TIA-1	Antigène intracellulaire des cellules T1
TIAR	Protéine apparentée à TIA-1 (TIA-1 related protein)
TP2	Transition protein 2
TTP	Tristetraproline
U snRNA	Petit ARN nucléaire U
UPS	Système ubiquitin-protéasome
vCJD	Creutzfeldt-Jakob variant

LISTE DES FIGURES

Introduction

- Figure 1 (p.2) Structure de la protéine prion cellulaire et mutations pathogéniques de PrP^C
- Figure 2 (p.21) La réponse au stress cellulaire
- Figure 3 (p.24) Dynamisme entre les granules de stress (GS) et les processing bodies (P-Bodies)
- Figure 4 (p.30) Schéma de l'implication du corps chromatoïde dans la cytodifférentiation des néoblastes et des cellules germinales de vers planaires

Article

- Figure 1 (p.60) Localization of mRNA, 5S rRNA, U1 snRNA, tRNA, 18S and 28S rRNAs in cells expressing different protein constructs
- Figure 2 (p.61) The domain located between residues 30 and 49 is necessary for the assembly of PrP-RNP
- Figure 3 (p.62) Aggresomal characteristics of PrP-RNPs
- Figure 4 (p.64) Localization of different RNAs in chromatoid bodies by *in situ* hybridization and confocal microscopy
- Figure 5 (p.66) miRNAs are concentrated in PrP-RNPs
- Figure 6 (p.67) Localization of Dcp1a, DDX6, Dicer, and SmB/B'/N in PrP-RNPs by confocal microscopy
- Figure 7 (p.68) PrP-RNPs are proximal to the nuclear envelope and contain FXFG repeats nucleoporins

- Figure 8 (p.69) Association of PrP-RNPs and vimentin
- Figure 9 (p.70) Cytoplasmic localization of endogenous PrP in germ cells containing a chromatoïd body

Figures supplémentaires

- Figure supplémentaire 1 (p.73) Graphique de l'intensité de rouge (ARN poly(A)) en fonction de l'intensité de vert (protéine PrP tronquée) chez les cellules transfectées (encadré vert) et non transfectées (encadré orangé) selon le compartiment cellulaire, c'est-à-dire soit la cellule complète, le cytoplasme et le noyau.
- Figure supplémentaire 2 (p.76) Localisation de PrP^C au niveau de la spermatogonie

1. Introduction

1.1. Généralités sur la protéine prion (PrP^C)

1.1.1. Le gène *PRNP*

La protéine PrP^C est encodée par le gène *PRNP* et est hautement conservée chez les mammifères (Gabriel et al. 1992). *PRNP* est transcrit constitutivement dans tous les tissus. *PRNP* humain est situé sur le bras court du chromosome 20 (Liao et al. 1986, Robakis et al. 1986a, Sparkes et al. 1986) et est composé de deux exons, l'exon 1 de 134 pb et l'exon 3 de 2355 pb, et d'un intron de 13 kb. Contrairement au *PRNP* humain qui ne contient pas l'exon 2, les *PRNP* murin, ovin et bovin possèdent un exon supplémentaire situé en amont des 2 exons de *PRNP* humains. La séquence promotrice de *PRNP* n'est pas constituée d'une boîte TATA, mais plutôt d'une boîte CCAAT (Mahal et al. 2001) et d'une région riche en GC (Prusiner and Scott 1997, Puckett et al. 1991, Shyu et al. 2002). Cette séquence riche en GC est un motif de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (McKnight and Tjian 1986). La séquence promotrice contient aussi deux éléments «heat shock» (HSE) situés à -680 pb et -1653 pb du site d'initiation de la transcription (Shyu et al. 2002, Shyu et al. 2000). L'exon 3 de la protéine humaine, qui correspond au deuxième exon de la protéine de souris, renferme l'unique séquence codante de la protéine incluant le 3' non traduit (Basler et al. 1986, Lee et al. 1998, Puckett et al. 1991). L'exon 1 correspond au 5' non traduit de l'ARNm de PrP^C (Basler et al. 1986, Prusiner and Scott 1997).

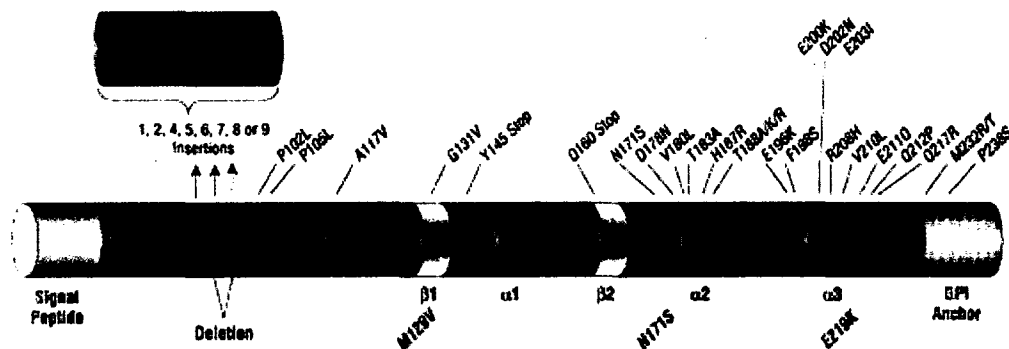


Figure 1. Structure de la protéine prion cellulaire et mutations pathogéniques de PrP^C

Le précurseur de PrP^C contient un signal peptide de localisation au RE (1-23) et un propeptide qui contient un signal d'addition d'une ancre GPI (231-254). PrP^C contient 5 répétitions d'un octapeptide connus pour lier des ions divalents. PrP^C mature (23-230) est diglycosylée sur les résidus Asn 181 et 197 et un pont disulfure est formé entre les cystéines 179 et 214. La région N-terminale de PrP^C n'est pas structurée cependant, le C-terminale contient deux feuillettes β et trois hélices α . Plusieurs maladies génétiques sont connues, et les différentes mutations associées sont indiquées. Adapté d'Archive Neurology, vol.62, American Medical Association 2005.

1.1.2 Structure de PrP^C

PrP^C est une protéine de 231 acides aminés, située majoritairement au niveau des rafts lipidiques de la membrane plasmique (Caughey 1991, Caughey et al. 1989, Harris 2003, Lee et al. 1998, Magalhaes et al. 2002, Negro et al. 2001). *PRNP* humain encode une protéine précurseure de 253 acides aminés. Le précurseur de PrP^C possède plusieurs domaines importants pour le transport, la localisation et la topologie de la protéine (Harris 2003). Les 22 premier acides aminés en N-terminal constituent le signal peptide de translocation au réticulum endoplasmique (RE) et est clivé lors des modifications post-traductionnelles (Basler et al. 1986, Heske et al. 2004, Robakis et al. 1986a, Robakis et al. 1986b, Stahl et al. 1987). Le domaine N-terminal de la protéine humaine contient aussi cinq copies d'un octapeptide P(H/Q)GGG(G)WGQ situées entre les résidus 51 et 91. Ce motif répété est hautement conservé entre les espèces, ce qui lui suggère un rôle important. Il est connu pour lier les ions divalents, préférentiellement le cuivre (Burns et al. 2002, Harris 2003, Jackson et al. 2001,

Kramer et al. 2001, Rachidi et al. 2003, Rachidi et al. 2005, Stockel et al. 1998). De plus, le domaine N-terminal de PrP^C est impliqué dans l'association de la protéine au réseau de microtubules (Hachiya et al. 2004a, Hachiya et al. 2004b). Cette région N-terminale de PrP^C est très flexible et peu structurée (Donne et al. 1997, Lopez Garcia et al. 2000, Zahn et al. 2000). Tandis que la partie C-terminale de PrP^C se compose de trois hélices alpha et de deux feuillets bêta (Donne et al. 1997, Lopez Garcia et al. 2000, Riek et al. 1996, Riek et al. 1997, Zahn et al. 2000). Le domaine C-terminal de la protéine contient aussi une région hydrophobe très conservée. Cette région hydrophobe comporte le deuxième signal peptide de la protéine permettant le clivage des résidus 231-253 et l'ajout d'une ancre glycoposphatidyl inositol (GPI) sur la Ser230 au niveau du RE (Caughey et al. 1989, Drisaldi et al. 2004, Stahl et al. 1987). Il serait aussi nécessaire pour la translocation de la protéine au niveau du RE, tout comme le domaine N-terminal (Heske et al. 2004). Lors des modifications post-traductionnelles, PrP^C subit une polyglycosylation sur deux résidus Asn, en position 181 et 197 (Endo et al. 1989, Haraguchi et al. 1989, Rudd et al. 1999, Stimson et al. 1999) et un pont disulfure se forme entre les cystéines 179 et 214. Les diverses modifications post-traductionnelles permettent à la protéine de bien se replier et de se retrouver ancrée à la membrane plasmique. Cependant, le patron de glycosylation de la protéine peut varier considérablement et ainsi produire de nombreux variants dont certains sont sujets à adopter une forme pathologique (Ermonval et al. 2003). PrP^C mature est une sialoglycoprotéine membranaire d'environ 27 KDa.

1.1.3. Le trafic intracellulaire de PrP^C est complexe

PrP^C et organelles cellulaires : La protéine PrP^C se retrouve majoritairement à la membrane plasmique, mais réside de façon minoritaire au niveau de certains compartiments intracellulaires comme le RE, l'appareil de Golgi et les vésicules endosomales. PrP^C étant

ancrée à la membrane plasmique, peut subir l'endocytose (Harris 2003, Lee et al. 2001, Magalhaes et al. 2002, Magzoub et al. 2006, Nunziante et al. 2003) et se trouver alors dans l'endosome précoce (Harris 2003, Magzoub et al. 2006, Nunziante et al. 2003). Ensuite, la protéine peut être soit recyclée à la membrane plasmique ou encore être dégradée au niveau de l'endosome tardif et du 'multi-vesicular bodies' (MVB) (Harris 2003, Magzoub et al. 2006, Nunziante et al. 2003). De plus, certaines études démontrent que PrP^C se retrouve aussi dans les exosomes (Fevrier et al. 2004, Fevrier et al. 2005, Robertson et al. 2006, Vella et al. 2007, Vilette et al. 2001). Les exosomes sont formés par l'invagination de la membrane du MVB et sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Les exosomes servent à se débarrasser des protéines indésirables et également à la communication intercellulaire (Stoorvogel et al. 2002, Thery et al. 2002).

Localisation nucléaire et cytoplasmique de PrP^C : Des études récentes ont démontrées que PrP^C possède une région basique, ²³KKRPKP²⁸, qui est similaire à une séquence de localisation nucléaire (Jaegly et al. 1995, Magzoub et al. 2006, Oglecka et al. 2008). Cette séquence est aussi impliquée dans le transport intracellulaire de PrP^C et dans son endocytose (Lundberg et al. 2002, Magzoub et al. 2006, Nunziante et al. 2003, Oglecka et al. 2008, Sunyach et al. 2003). D'autres études affirment que PrP^C se localise non seulement à la membrane plasmique mais aussi au niveau du cytoplasme et du noyau de façon minoritaire (Gu et al. 2003, Hosokawa et al. 2008, Lundberg et al. 2002, Magzoub et al. 2006, Oglecka et al. 2008). Un autre groupe a montré par microscopie électronique, la présence de PrP^C cytoplasmique dans une sous population de neurones au niveau de l'hippocampe, du néocortex et du thalamus de souris (Mironov et al. 2003). Il est connu que le signal peptide de translocation au RE de PrP^C est beaucoup moins efficace que d'autres signaux peptidiques. Cette efficacité moindre pourrait expliquer la présence de PrP^C au niveau du cytoplasme

(Rane et al. 2004). Il a été aussi découvert qu'en condition de stress au RE, PrP^C s'accumule davantage dans le cytoplasme des cellules (Orsi et al. 2006). Certaines études suggèrent que la présence de PrP^C dans le cytoplasme serait dû à un mauvais repliement de la protéine au niveau de la lumière du RE, ce qui induit la retranslocation de PrP^C au niveau du cytoplasme afin d'être dégradée par le protéasome ou d'autres protéases (Ma and Lindquist 2001, Stewart et al. 2001, Wang et al. 2005b). D'autres études proposent qu'une portion de PrP^C ne transloque jamais au niveau du RE et reste dans le cytoplasme (Harris 2003, Stewart et al. 2001). Récemment, il a été publié qu'en condition hypoxique, il y a induction d'un nouveau variant de PrP^C ne contenant pas l'ancre GPI. Ce nouveau variant de PrP^C se localise au niveau du cytoplasme des cellules (Kikuchi et al. 2008, Norstrom et al. 2007). Une autre étude récente montre non seulement la présence de la protéine au niveau de la membrane et du cytoplasme des cellules bêta pancréatiques, mais aussi la formation d'une structure similaire aux agrésomes. L'agrésome est une structure protéique induite par l'accumulation cytoplasmique de protéines dénaturées ne pouvant pas être dégradées par le protéasome mais plutôt par autophagie. Cette étude suggère un rôle de PrP^C cytosolique dans le diabète de type II et l'hyperglycémie (Norstrom et al. 2007).

1.1.4. Rôles physiologiques de PrP^C

Aucun rôle précis n'a été encore attribué à PrP^C, cependant les divers travaux effectués ces 20 dernières années lui ont suggéré des rôles généraux dans divers processus cellulaires. Les premières études avec les souris transgéniques, dont le gène *PRNP* est supprimé (souris *knock-out*, souris KO), démontrent que PrP^C n'est pas une protéine essentielle puisque la délétion du gène PrP^C n'a aucune influence sur le développement général et la reproduction des souris KO (Bueler et al. 1992, Manson et al. 1994, Moore et al. 1999, Prusiner et al. 1993). Cependant, lors du vieillissement des souris, une démyélinisation du système nerveux

périphérique est observée mais sans symptôme clinique (Nishida et al. 1999). D'autres études montrent que les souris KO acquièrent certains phénotypes décrits ci-dessous.

Trouble du sommeil, excitabilité neuronale, mémoire et apprentissage: Les phénotypes les moins contestés sont le trouble du sommeil et une altération du rythme circadien (Tobler et al. 1997, Tobler et al. 1996). Certaines mutations dans *PRNP* sont connues pour produire des troubles du sommeil et de l'insomnie (Collinge et al. 1994, Landolt et al. 2006, Lugaresi et al. 1998). Certaines études, un peu controversées, ont montrées que les souris KO subiraient une altération au niveau de l'excitabilité des neurones, de la mémoire et de l'apprentissage (Colling et al. 1996, Collinge et al. 1994, Criado et al. 2005, Lipp et al. 1998, Lledo et al. 1996, Manson et al. 1995, Roesler et al. 1999, Whittington et al. 1995). En plus, une étude sur le polymorphisme de PrP^C humaine montre aussi que PrP^C pourrait être impliquée au niveau de l'apprentissage et de la mémoire (Papassotiropoulos et al. 2005, Sakudo et al. 2006).

Stress oxydatif et le cuivre: Plusieurs travaux proposent que PrP^C aurait un rôle dans la réponse au stress oxydatif et la neuroprotection (Moore et al. 1999, Rossi et al. 2001, Sakaguchi et al. 1996, Sakudo et al. 2006, Silverman et al. 2000, Wong et al. 2001). Les souris KO sont plus susceptibles au stress oxydatif puisque le degré d'oxydation de leurs protéines et lipides est plus élevé que celui des souris sauvages (Klamt et al. 2001, Wong et al. 2001). La propriété de PrP^C de lier le cuivre par son domaine répété P(H/Q)GGG(G)WGQ pourrait expliquer la déstabilisation de l'homéostasie du cuivre et ainsi la susceptibilité des souris KO au stress oxydatif. Le cuivre est un oligo-élément essentiel en trace mais très toxique à plus forte dose. En fait, une augmentation du cuivre intracellulaire induit un stress oxydatif à la cellule via la réaction de Fenton qui génère des radicaux libres.

Ainsi, l'oxydation des protéines et des lipides se produit. De plus, certaines études montrent que PrP^C serait impliquée dans la régulation de l'activité superoxyde dismutase de la cellule (Brown and Besinger 1998, Klamt et al. 2001, Sakudo et al. 2005a, Sakudo et al. 2005b). Donc, PrP^C aurait un rôle au niveau de l'homéostasie du cuivre et de la réponse au stress oxydatif (Sakudo et al. 2006, White et al. 1999). Également certains travaux révèlent que l'expression de PrP^C est régulée par divers types de stress cellulaires (Sakudo et al. 2006, Shyu et al. 2002, Shyu et al. 2000, Shyu et al. 2004, Wang et al. 2005a).

La neuroprotection: La neuroprotection est un autre rôle suggéré pour PrP^C puisqu'elle contrebalance la neurotoxicité de son homologue Doppel (Anderson et al. 2004, Nishida et al. 1999, Sakaguchi et al. 1996, Valenti et al. 2001, Yamaguchi et al. 2004). La protéine Doppel est une protéine membranaire similaire au domaine C-terminal de PrP^C. Il a été proposé que le domaine N-terminal de PrP^C aurait un rôle neuroprotecteur et anti-apoptotique (Atarashi et al. 2003, Moore et al. 1999, Rossi et al. 2001, Sakaguchi et al. 1996, Sakudo et al. 2006, Silverman et al. 2000). D'autres études démontrent que PrP^C est impliquée dans la survie cellulaire lors de lésion ischémique ou de traumatisme cérébral (Hoshino et al. 2003, McLennan et al. 2004, Sakudo et al. 2006, Sakurai-Yamashita et al. 2005, Spudich et al. 2005, Weise et al. 2004, Weise et al. 2006).

Le système immunitaire et les cellules souches hématopoïétiques et neuronales: PrP^C serait aussi impliquée dans le système immunitaire (Sakudo et al. 2006). Par exemple, certains groupes mettent en évidence que PrP^C influence le niveau de phagocytose et de cytokines produites (de Almeida et al. 2005, Kubosaki et al. 2003). De plus, PrP^C serait importante pour l'interaction entre l'hôte et le pathogène ainsi que pour l'activation des lymphocytes T et leurs interactions avec les cellules dendritiques (Bastian et al. 2007, Leblanc et al. 2006, Lotscher et

al. 2007, Sakudo et al. 2006, Thackray and Bujdoso 2002, Thackray and Bujdoso 2006, Watarai et al. 2003, Zhang et al. 2006). Certaines études montrent que PrP^C a un rôle au niveau des cellules souches hématopoïétiques et neuronales lors de leur détermination et différenciation (Sakudo et al. 2006, Steele et al. 2006, Weissmann and Flechsig 2003, Zhang et al. 2006).

Voie de signalisation et interaction protéine-protéine : Certains travaux sur les voies de signalisation ont permis de découvrir que l'activité et/ou le niveau d'expression de certaines protéines importantes dans la signalisation comme Akt, Fyn, AMPc, Bax, Erk1/2 et STAT1 sont modulées par l'expression de PrP^C (Clarke et al. 2000, Combs et al. 1999, Gains et al. 2006, Herms et al. 1997, Oh and Schnitzer 2001, Satoh et al. 2000, Spudich et al. 2005, Vassallo et al. 2005, Weise et al. 2006). Ces études suggèrent que PrP^C aurait un rôle dans la survie cellulaire et dans la neuritogénèse (Bragason and Palsdottir 2005, Hu et al. 2008, Lopes et al. 2005). En plus, des études d'interactions ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence que PrP^C interagit de façon directe ou indirecte avec une centaine de protéines (Marc et al. 2007, Petrakis and Sklaviadis 2006, Satoh et al. 2008, Strom et al. 2006, Wechselberger et al. 2002). Ceci permet de confirmer certaines hypothèses discutées précédemment et suggère d'autres rôles possibles de PrP^C, par exemple son implication au niveau de l'adhésion cellulaire (Hu et al. 2008, Wechselberger et al. 2002). De plus, ces études ont révélé des interactions encore incomprises, par exemple, l'interaction de PrP^C avec certaines protéines liant les ARNs (Aguzzi et al. 2008, Petrakis and Sklaviadis 2006, Satoh et al. 2008, Strom et al. 2006, Warner et al. 2002). Donc, depuis une vingtaine d'années, l'implication de PrP^C dans des grands processus cellulaires a été montrée, bien qu'aucun rôle précis ne lui a été encore attribué.

1.2. Les maladies à prion et les formes pathologiques de PrP^C

1.2.1. Pathologies des maladies à prion

Les maladies à prion ou encore les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) sont des maladies neurodégénératives infectieuses. Elles sont actuellement toujours fatales. Les ESTs possèdent quatre signes pathologiques importants au niveau cellulaire: le dépôt extracellulaire de formes infectieuses de PrP^C appelées PrP^{Sc}, la vacuolisation du cerveau donnant son aspect spongieux, une astrogliose, c'est-à-dire la prolifération anormale des astrocytes, et une neurodégénérescence (Budka 1997). Le dépôt extracellulaire de PrP^{Sc} et la vacuolisation sont deux caractéristiques pathologiques qui sont spécifiques aux ESTs. La neurodégénérescence peut affecter différentes régions du système nerveux central telles que l'hippocampe, le thalamus, le cervelet, et la moelle épinière (Brownell and Oppenheimer 1965, Budka 1997, Budka 2000, Richardson and Masters 1995, Wadsworth et al. 2003).

1.2.2. Les trois formes des maladies à prion

Les ESTs les plus répandues chez les animaux sont la tremblante du mouton (scrapie), la maladie débilitante chronique des cervidés (CWD) et l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE). Ces maladies ont eu un impact économique néfaste et la BSE est la seule EST animale qui est connue pour être transmissible à l'homme. Chez l'humain, les ESTs incluent la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), l'insomnie fatale familiale (FFI), le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), le kuru, la maladie variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) et plusieurs autres. Les ESTs sont des maladies progressant lentement avec une longue période de latence et suivi d'une neuroinvasion sévère. Les ESTs sont divisées en trois catégories selon leur mode d'acquisition, soit la forme sporadique, la forme génétique et la forme acquise par transmission entre individus, espèces ou interventions chirurgicales (Collinge 1997, Collinge and Palmer 1994, Prusiner 1989, Wadsworth et al. 2003). Leurs

prévalences sont respectivement de 85%, 10% et 5%. Des études sur le polymorphisme de PrP^C montrent que le polymorphisme homozygote méthionine ou valine au codon 129 prédispose les humains au développement sporadique et acquise de la maladie (Collinge et al. 1991, Mead et al. 2003, Palmer et al. 1991, Wadsworth et al. 2003, Windl et al. 1996). De plus, ce polymorphisme peut affecter la pathologie des formes génétiques des ESTs.

Maladies sporadiques : Les ESTs sporadiques représentent 85% des cas. La plus commune chez l'homme est la maladie sporadique Creutzfeldt-Jakob (sCJD). sCJD se caractérise par une démence sévère accompagnée d'une myoclonus, un trouble du sommeil et habituellement, la mort s'en suit un an après la déclaration de la maladie (Gambetti et al. 2003, Glatzel et al. 2005). Chez les animaux, les plus connues sont la tremblante du mouton (scrapie), la BSE et la CWD. Ces ESTs ont toutes eu un fort impact socio-économique. L'origine des ESTs sporadiques demeure un mystère (Collinge 1997, Wadsworth et al. 2003), cependant un changement physico-chimique dans l'environnement cellulaire est l'hypothèse la plus probable. Certaines études démontrent que les individus homozygotes pour polymorphisme méthionine ou valine au codon 129 sont plus susceptibles aux ESTs sporadiques.

Maladies génétiques: Les formes génétiques sont divisées en trois phénotypes soit les maladies Creutzfeldt-Jakob familiale (fCJD), le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (FFI). Ces maladies sont causées par des mutations dans le gène *PRNP* et leur mode d'hérédité est du type autosomique dominant (Glatzel et al. 2005, Harder et al. 1999). Les maladies fCJD n'ont aucune particularité clinique par rapport aux maladies sCJD et elles sont diagnostiquées seulement par séquençage (Glatzel et al. 2005, Windl et al. 1999). Plusieurs maladies fCJD sont causées par l'insertion ou la délétion d'une

répétition de l'octapeptide au niveau du domaine répété P(H/Q)GGG(G)WGQ de PrP^C (Goldfarb et al. 1991, Laplanche et al. 1990, Owen et al. 1989, Poulter et al. 1992, Vnencak-Jones and Phillips 1992). D'autres mutations dans le gène *PRNP* peuvent être la cause de maladies fCJD (Goldfarb et al. 1990, Hsiao et al. 1991). Le syndrome GSS est caractérisé par une ataxie cérébrale progressant lentement et accompagnée d'une détérioration au niveau cognitif (Ghetti et al. 1995, Glatzel et al. 2005). Cette maladie se caractérise par la formation de plaques amyloïdes de PrP (Glatzel et al. 2005, Piccardo et al. 1995). Plusieurs mutations sont connues pour induire la maladie GSS. Par exemple, les trois mutations les plus communes sont P102L, G131V et A117V. Cette dernière mutation génère une nouvelle forme topologique de PrP^C qui devient une protéine transmembranaire (Bratosiewicz-Wasik et al. 2004, Crozet et al. 2008, Hegde et al. 1998). Ce mutant se nomme ^{Ctm}PrP puisque le domaine C-terminal se retrouve au niveau de la lumière du RE. D'autres mutations peuvent amener la formation d'une forme transmembranaire de PrP^C soit ^{Ctm}PrP ou ^{Ntm}PrP. Finalement, la mutation D178N combinée avec le polymorphisme homozygote pour la méthionine au codon 129 résulte en la dernière classe des ESTs génétiques, c'est-à-dire les maladies FFI (Goldfarb et al. 1992, Medori et al. 1992). Celles-ci sont caractérisées par une perturbation du cycle du sommeil, de l'insomnie non traitable, de la démence, une dégénérescence sélective du thalamus et une surstimulation sympathique (Glatzel et al. 2005, Padovani et al. 1998, Wadsworth et al. 2003). Un des signes pathologiques est la déposition de la forme pathologique PrP scrapie (PrP^{Sc}) au niveau du thalamus. La maladie se déclare vers l'âge de 50 ans avec un problème progressif du sommeil et la mort s'en suit dans l'année à venir (Lugaresi et al. 1986).

Maladies acquises par transmission: Plusieurs ESTs acquises par transmission sont bien connues, par exemple, la maladie variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) dont l'origine

serait de source animale, c'est-à-dire la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine à l'humain. De plus, le Kuru est une autre EST acquise par transmission entre individus lors de rituel cannibale. L'épidémie de Kuru qui a presque anéanti un peuple de la Papouasie-Nouvelle-Guinée dans les années 1950 montre bien l'impact épidémiologique des ESTs (Gajdusek and Alpers 1972, Palpers 2005). Contrairement à la forme sporadique, vCJD peut aussi toucher les jeunes adultes. Chez les animaux, la BSE est la plus connue. L'épidémie de BSE et sa transmission à l'homme révèlent bien les retombées socio-économiques des ESTs. Depuis, beaucoup d'études ont été entreprises par différents pays afin de mieux comprendre les ESTs et de découvrir leur origine. Par exemple, la cause de l'épidémie de BSE est la présence de farine d'os d'animaux contaminés dans la nourriture des bovins.

1.2.3. La protéine prion scrapie, PrP^{Sc}

Les prions ou encore la forme infectieuse de PrP^C sont appelées généralement PrP^{Sc}. PrP^{Sc} se retrouve sous différentes formes soit sous forme de monomères, d'oligomères et de fibres amyloïdes ou de plaques amyloïdes. La formation de PrP^{Sc} se caractérise par un changement conformationnel de PrP^C se traduisant par la conversion d'une hélice alpha et de la partie N-terminale non structurée en feuillet bêta et ainsi la protéine devient majoritairement constituée de feuillets bêta (Pan et al. 1993). Cette conversion se fait possiblement par contact physique entre les agrégats extracellulaires de PrP^{Sc} exogènes et le PrP^C membranaire et impliquerait vraisemblablement une protéine X servant de chaperonne (Hachiya et al. 2007, Kaneko et al. 1997, Solforosi et al. 2007, Telling et al. 1995). L'apparition de PrP^{Sc} dans les ESTs sporadiques et héréditaires est probablement due à une conversion spontanée de PrP^C en sa forme pathogène dictée soit par les mutations ou encore par des environnements physico-chimiques particuliers (Redecke et al. 2007). L'augmentation de feuillets bêta rend la protéine PrP^C très susceptible à l'agrégation (Malolepsza et al. 2005). Récemment, il a été

démontré que les plus petites particules infectieuses de PrP^{Sc} sont constituées de 14 à 28 molécules de PrP^{Sc} (Silveira et al. 2005). PrP^{Sc} possède des caractéristiques spécifiques qui sont: la résistance des agrégats de PrP^{Sc} à la dégradation par la protéinase K, leur insolubilité dans des détergents non-ioniques, leur propriété d'être infectieux et leur résistance aux différentes méthodes classiques de stérilisation. La résistance à la protéinase K est une caractéristique de PrP^{Sc} qui est utilisée pour diagnostiquer les ESTs. De ce fait, la forme PrP^{Sc} est aussi appelée PrP^{res} par opposition à PrP^{sen} qui désigne PrP^C native sensible à la protéinase K. **De plus en plus d'études démontrent que PrP^{Sc} est l'agent de transmission des ESTs mais n'est pas l'agent toxique des ESTs.** Par exemple, chez les souris, l'inhibition conditionnelle de l'expression du gène *PRNP* renverse le phénomène de spongiose associé à des titres élevés de PrP^{Sc} dans le cerveau de souris infectées (Mallucci et al. 2003). D'autres études révèlent, par des souris KO pour PrP^C, que la présence de PrP^C est nécessaire pour la transmission et la neurotoxicité des ESTs (Mallucci et al. 2003). Certains travaux montrent que les oligomères de PrP^{Sc} seraient neurotoxiques (Freixes et al. 2004, Simoneau et al. 2007). Une autre hypothèse pour expliquer la neurotoxicité des ESTs est l'accumulation de PrP^C dans le cytoplasme.

1.2.4. La protéine prion cytoplasmique

Généralités : PrP^C peut se retrouver normalement en très faible quantité dans le cytosol d'une sous-population de neurone au niveau de l'hippocampe, du néocortex et du thalamus. Il est connu que PrP^C mal repliée est dégradée par le *endoplasmic reticulum-associated degradation proteasome pathway* (ERAD) lorsque sa relocalisation au cytoplasme est possible (Crozet et al. 2008, Yedidia et al. 2001). Un dysfonctionnement du protéasome cytoplasmique peut mener à l'accumulation de PrP^C au niveau du cytoplasme et ainsi activer une voie de la mort neuronale (Crozet et al. 2008, Ma and Lindquist 2001, Ma et al. 2002).

De plus, en culture cellulaire, le traitement avec un inhibiteur de protéasome engendre une accumulation d'une forme cytoplasmique non glycosylée de PrP^C (Crozet et al. 2008). Cette forme de PrP^C possède des caractéristiques biochimiques similaires à PrP^{Sc}, c'est-à-dire l'insolubilité dans les détergents non-ioniques et la résistance à la protéinase K. Récemment, il a été démontré que dans les ESTs, la sous-unité protéolytique bêta du protéasome 26S est spécifiquement inhibée et que le système d'ubiquitin-protéasome (UPS) est moins efficace chez les souris infectées (Crozet et al. 2008, Kristiansen et al. 2007). D'autre part, il est connu que lors du vieillissement, le système de contrôle de qualité du RE et de l'UPS est affecté et ainsi ce dysfonctionnement pourrait induire l'accumulation cytoplasmique de PrP^C et son agrégation. PrP^C et PrP^{Sc} sont sujettes au transport rétrograde, c'est-à-dire de la membrane plasmique vers le RE et du RE au cytosol (Ma and Lindquist 2001, Ma and Lindquist 2002, Yedidia et al. 2001). Ce transport rétrograde joue un rôle important dans la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} (Beranger et al. 2002, Ma and Lindquist 2001, Ma and Lindquist 2002). Certaines travaux suggèrent que PrP^{Sc} perturberait le repliement et le transport de PrP^C (Ma et al. 2002).

Neurotoxicité de PrP^C cytoplasmique : Il a été aussi démontré que dans certaines ESTs, il y avait la présence de PrP^C cytosolique et de formes transmembranaires (Heske et al. 2004, Stewart and Harris 2003). Les études ont montré que le PrP^C cytosolique et la forme ^{C_{tm}}PrP interfèrent avec la viabilité cellulaire (Hachiya et al. 2005, Helmus et al. 2008, Heske et al. 2004, Rambold et al. 2006, Stewart and Harris 2003, Zanusso et al. 1999). **De plus en plus d'études montrent que l'accumulation de PrP cytoplasmique pourrait être l'agent neurotoxique** (Kristiansen et al. 2005). Par exemple, des souris transgénique exprimant une forme tronquée de PrP^C, ne contenant pas les 2 signaux peptides, développent une sévère ataxie, une dégénérescence du cervelet et une astrogliose (Ma et al. 2002, Weissmann and

Flechsig 2003). Cette forme tronquée de PrP^C (PrP 23-231) se localise au niveau du cytoplasme de la cellule et est nommée CyPrP. Il a été démontré que l'expression de CyPrP chez *C.elegans* est aussi très toxique (Park and Li 2008). Cependant, une récente étude révèle que la maladie neurodégénérative induite par CyPrP n'est pas transmissible et que la neurotoxicité est indépendante de l'expression de PrP^C (Norstrom et al. 2007) contrairement à celle causée par PrP^{Sc}. L'accumulation de PrP^C dans le cytoplasme peut induire son agrégation et ensuite former une grosse structure protéique périnucléaire se localisant au niveau du centre d'organisation des microtubules (MTOC) qu'on appelle agrésome. Il est connu que la formation d'une telle structure peut induire l'activation des caspases et de l'apoptose (Grenier et al. 2006, Kristiansen et al. 2005). Ces structures sont observées soit en présence d'inhibiteur de protéasome mimant l'inhibition observée lors de la sénescence ou des ESTs (Kristiansen et al. 2007). L'agrésome de PrP est composé de PrP^{Sc}, de la protéine Hsp70, l'ubiquitin, les sous-unités du protéasome et est entouré d'une cage de vimentine, filaments intermédiaires (Beranger et al. 2002). Il a été démontré que la protéine NRAGE (neurotrophin receptor interacting MAGE homolog) interagit avec PrP^C et colocalise avec l'agrésome de PrP après inhibition du protéasome. Cette interaction semble affecter le potentiel membranaire des mitochondries, un signe d'apoptose. Ainsi, les auteurs suggèrent que cette interaction cytoplasmique de PrP^C et de NRAGE pourrait affecter la viabilité neuronale (Bragason and Palsdottir 2005). Il est bien établi que PrP^C cytoplasmique peut interagir avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la co-agréger et ainsi induire l'apoptose. La surexpression de chaperonnes Hsp comme la Hsp70 et la Hsp40, inhibe la co-agrégation de PrP et de Bcl-2 et ainsi l'apoptose (Lin et al. 2004, Pasinelli et al. 2004, Rambold et al. 2006). Cependant, il est bien établi que chez les cellules infectées par PrP^{Sc}, il y a inhibition de l'expression Hsp70 (Tatzelt et al. 1995). L'étude de Kristiansen révèle que, chez cellules infectées par PrP^{Sc}, il y a formation d'un agrésome de PrP^{Sc} après un traitement aux

inhibiteurs de protéasome et que cette agrésome de PrP^{Sc} est cytotoxique (Bence et al. 2001, Grune et al. 2004, Kristiansen et al. 2005). Cette étude suggère la présence d'agrésome de PrP^{Sc} chez les souris infectées puisqu'ils ont démontré par immunoprécipitation une interaction spécifique entre PrP^{Sc} et les filaments de vimentine. Il est connu que l'agrésome protéique est entouré d'une cage de vimentine (Kristiansen et al. 2005).

PrP cytoplasmique et stress cellulaire : Récemment, en utilisant CyPrP (PrP 23-231) nous avons montré que l'agrésome de PrP est une particule poly(A)⁺-ribonucléoprotéique induisant un stress cellulaire PKR-dépendante (RNA-dependent protein kinase) (Goggin et al. 2008). L'activation de la voie PKR induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction (eIF2 α), résultant à l'arrêt de la synthèse protéique. De plus, lors de stress cellulaire, il y a normalement formation des granules de stress, site de stockage des ARNm non essentiels, et synthèse de protéines Hsp70. Cependant, nous avons montré que l'agrésome de PrP inhibe la formation des granules de stress et la synthèse de Hsp70 lors de stress cellulaire rendant ainsi les cellules plus sensibles au stress cellulaire et à l'apoptose (Goggin et al. 2008). Une autre étude montre que lors de stress cellulaire, stress oxydatif et heat shock, les cellules neuronales infectées n'induisent pas la synthèse de protéine Hsp70 (Tatzelt et al. 1995). Cette caractéristique commune entre les cellules infectées par PrP^{Sc} et les cellules exprimant PrP cytosolique supporte l'hypothèse que l'agrésome de PrP peut être présent chez les animaux infectés et participé à la neurotoxicité des maladies à prion (Goggin et al. 2008, Kristiansen et al. 2005, Tatzelt et al. 1995). De plus, différentes formes pathologiques de PrP sont aussi associées à la formation d'agrésomes. Par exemple, le mutant D177N chez la souris (D178N chez l'humain), associé à une certaine forme transmise d'EST, forme des agrésomes dans des cellules de neuroblastome de souris N2a, même en absence d'inhibiteur de protéasome (Ma and Lindquist 2001). L'effet neurotoxique de PrP^C cytoplasmique semble être dépendant du

type cellulaire puisque certaines études révèlent que PrP cytosolique n'est pas toxique et même qu'il est neuroprotecteur (Crozet et al. 2006, Fioriti et al. 2005, Roucou et al. 2003).

1.3. La protéine prion et les acides nucléiques

1.3.1. Interaction entre PrP^C, PrP^{Sc} et les acides nucléiques

Spécificité et domaine d'interaction: PrP^C est une protéine basique et peut donc lier des composés chargés négativement comme les acides nucléiques. Beaucoup d'études *in vitro* ont été effectuées afin de mieux caractériser l'interaction de PrP^C et PrP^{Sc} avec les acides nucléiques. La première étude *in vitro* a montré que le peptide 106-126 de PrP^C interagit avec l'ADN (Nandi 1997, Nandi and Leclerc 1999). L'interaction de PrP^C ou du peptide 106-126 avec les acides nucléiques induit leurs agrégations (Cordeiro et al. 2004, Nandi and Leclerc 1999, Nandi and Sizaret 2001). Depuis, plusieurs études ont été entreprises afin de déterminer une spécificité dans l'interaction avec les acides nucléiques (Adler et al. 2003, Cordeiro et al. 2004, Cordeiro et al. 2001, Kocisko et al. 2006, Lima et al. 2006, Riesner et al. 1993). En utilisant la méthode SELEX, différents laboratoires ont identifiés des aptamères d'ADN (Takemura et al. 2006) et d'ARN (Geoghegan et al. 2007, Mercey et al. 2006, Proske et al. 2002, Rhie et al. 2003, Weiss et al. 1997) interagissant spécifiquement avec PrP^C ou PrP^{Sc} (Rhie et al. 2003, Sayer et al. 2004, Sekiya et al. 2005). Une comparaison des différentes séquences des aptamères étudiés n'a pas permis d'identifier un motif conservé. Un seul laboratoire, celui de Famulok, ont trouvé un motif guanine quartets (G-quartets) se retrouvant dans la majorité de leurs aptamères (Proske et al. 2002, Weiss et al. 1997), mais on ne retrouve pas ce motif dans d'autres aptamères connus interagissant spécifiquement avec PrP^C (Rhie et al. 2003, Sayer et al. 2004). Une autre étude a identifié deux motifs similaires entre les aptamères d'ARN non modifiés interagissant avec PrP^C ovin et les autres aptamères obtenus des autres laboratoires indépendants. Les auteurs suggèrent que PrP^C interagit

préférentiellement avec des acides nucléiques contenant un patron bien défini (Mercey et al. 2006). De plus, plusieurs études ont localisées le domaine de la protéine responsable de l'interaction avec les acides nucléiques dans la région N-terminale de PrP^C (Adler et al. 2003, Lima et al. 2006, Mercey et al. 2006, Nandi 1997, Nandi and Leclerc 1999, Nandi and Sizaret 2001, Proske et al. 2002, Rhie et al. 2003, Riesner et al. 1993, Weiss et al. 1997). Weiss et al. ont identifié les acides aminés 23-52 comme étant le site principal d'interaction (Weiss et al. 1997). Ce site est probablement celui possédant le moins de spécificité mais une grande affinité qui est basée sur une interaction ionique (Rhie et al. 2003). Ce site d'interaction coïncide avec le motif « lysine cluster » qui est impliqué dans une interaction avec l'héparine (Pan et al. 2002). Une autre étude confirme que le motif lysine cluster est impliqué dans l'interaction de PrP^C avec les acides nucléiques (Mercey et al. 2006, Riesner et al. 1993). Il est intéressant de noter que l'alternance de résidus prolines et basiques qu'on retrouve dans le motif lysine cluster est très similaire à des motifs de liaison qu'on retrouve dans des protéine liant les acides nucléiques (Iwasaki et al. 1992, Rajendran and Nagy 2003). D'autres travaux ont établi avec moins de précision un deuxième site d'interaction de PrP^C avec les acides nucléiques, celui-ci serait localisé après les 90 premiers acides aminés. Par exemple, certains aptamères d'ARN peuvent lier le peptide 90-129 (Proske et al. 2002) ou le peptide 110-230 (Rhie et al. 2003). Un autre groupe confirme la présence de deux sites importants pour la liaison de PrP^C avec les acides nucléiques, un se situant au niveau du domaine N-terminal non structuré et l'autre au niveau du domaine globulaire de PrP^C, le domaine C-terminal (Lima et al. 2006). Récemment, le groupe de Prusiner a identifié aussi deux sites d'interaction de PrP^C avec les acides nucléiques en utilisant un thioaptamère d'ADN simple brin (King et al. 2007).

Activité ARN chaperonne: Il est bien établi que PrP^C possède aussi *in vitro* des propriétés de chaperonne à ARN (Derrington et al. 2002, Gabus et al. 2001). Ces études montrent que

PrP^C peut lier l'ARN de HIV et l'ARNt-Lys et possède une activité de chaperonne à ARN similaire à la protéine virale NCp7, protéine constituant la nucléocapside de HIV-1. Les auteurs ont montrés que le domaine N-terminal de PrP^C (acides aminés 23-144) est responsable de cette activité chaperonne à ARN (Derrington et al. 2002, Gabus et al. 2001). Cette liaison de PrP^C avec l'ARN HIV n'a aucune influence sur la synthèse et l'épissage de celui-ci. Cependant, la traduction des protéines virales est diminuée dans les cellules exprimant fortement PrP^C (Leblanc et al. 2004). Certaines équipes suggèrent que PrP^C est impliquée dans le bon repliement des molécules d'ARNs ou encore pourrait participer dans le métabolisme des ARNs, c'est-à-dire au niveau de la traduction, du transport, du silencing et de la dégradation (Derrington et al. 2002, Gabus et al. 2001, Marc et al. 2007). De plus, Leblanc et al. ont démontrés que l'infection au HIV induit une résistance de PrP^C contre la digestion à la protéinase K (Leblanc et al. 2004) et que l'infection au rétrovirus augmente considérablement l'infektivité de PrP^{Sc} (Carp et al. 1998, Carp et al. 1999, Leblanc et al. 2006, Moscardini et al. 2002). D'autre part, il a été prouvé que NCp7 interagit comme PrP^C avec le motif G-quartets au niveau de l'ARN et l'ADN favorisant ainsi la formation de G-quatets et l'agrégation de l'ARN (Lyonnais et al. 2003).

Les acides nucléiques et la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}: Il est bien établi que l'interaction de PrP^C avec les acides nucléiques rend la protéine partiellement résistante à la protéinase K et favorise l'oligomérisation et l'agrégation de PrP^C (Adler et al. 2003, Nandi and Leclerc 1999, Nandi and Sizaret 2001). Récemment, une étude a démontrée que le domaine N-terminal de PrP^C interagit avec les ARNs cellulaires des cellules N2a induisant ainsi l'agrégation de PrP^C et une toxicité (Gomes et al. 2008). Plus précisément, les acides aminés 51-90 seraient responsables de l'interaction avec les acides nucléiques et de son agrégation (Gomes et al. 2008). Il est aussi connu que certaines séquences spécifiques d'ADN induisent

la conversion de PrP^C en une isoforme soluble riche en feuillet bêta (Cordeiro et al. 2001, Silva et al. 2008). Certaines études confirment que la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} est catalytiquement favorisée en présence d'acides nucléiques et plus spécifiquement d'ARNs (Cordeiro and Silva 2005, Gomes et al. 2008, Lima et al. 2006, Silva et al. 2008, Deleault et al. 2003). Il est bien établi que l'interaction de PrP^C avec les acides nucléiques déstabilise le repliement de PrP^C et induit la conversion de PrP^C en une forme résistante à la protéinase K appelé PrP^{res}. En plus, le traitement à RNase inhibe cette conversion de PrP^C en PrP^{res} (Adler et al. 2003, Cordeiro et al. 2001, Deleault et al. 2005, Deleault et al. 2007, Deleault et al. 2003, Nandi et al. 2002, Nandi and Nicole 2004). Certaines études montrent que l'ARN hautement structuré peut aussi induire la conversion de PrP^C en une forme similaire à PrP^{Sc} en ce qui concerne la résistance à la protéinase K. Certains aptamères d'ARN lient spécifiquement PrP^C produite de façon recombinante et induisent un changement de conformation d'hélices α en feuillets β (Deleault et al. 2005, Deleault et al. 2007, Rhie et al. 2003, Sayer et al. 2004). Par contre, certaines études montrent que l'interaction de PrP^C avec certaines séquences d'acides nucléiques diminue l'accumulation de PrP^{Sc} (Proske et al. 2002, Rhie et al. 2003) ou encore que les acides nucléiques ont une activité anti-PrP^{Sc} (Kocisko et al. 2006). Des évidences nous suggèrent que cette interaction peut subvenir *in vivo* (Kellings et al. 1994, Mange et al. 2004b, Nandi and Nicole 2004, Safar et al. 2005). Récemment, nous avons montré que l'agrésome de PrP dans des cellules N2a est une particule ribonucléoprotéique (RNP) liant les ARN poly(A)⁺ induisant ainsi l'agrégation des ARNs.

1.4. Les granules d'ARN

1.4.1. Les granules de stress (GS)

La réponse au stress cellulaire : La réponse au stress se caractérise par 5 éléments importants soit: 1) l'activation d'une des quatre kinases de stress (Fagard and London

1981, Galabru and Hovanessian 1987, Wu and Kaufman 1997) soit HRI (heme-regulated inhibitor kinase) (Chen 2007, Maxwell and Rabinovitz 1969), PKR (RNA-dependent protein kinase) (Bommer et al. 2002, Hovanessian and Galabru 1987, Ito et al. 1999, Patel and Sen 1998), GCN2 (glucose control non repressible 2) (Jiang and Wek 2005, Lee et al. 2008, Parker et al. 2006, Towle 2007, Zhang et al. 2002) et PERK (PKR-like ER resident kinase) (Harding et al. 2000, Harding et al. 1999), 2) la phosphorylation du facteur d'initiation à la traduction, eIF2 α (Kudlicki et al. 1987, Price and Proud 1990), 3) l'inhibition de la traduction (Krishnamoorthy et al. 2001), 4) la formation de granules de stress (GS), décrit ultérieurement, et 5) l'expression de protéines heat shock, protéines chaperonnes (Head et al. 1994, Nakai and Ishikawa 2000, Pelham 1982). En fait, la phosphorylation de eIF2 α par une des quatre kinases de stress inhibe la traduction de la majorité des ARNm. Ainsi, les ARNm non traduits vont alors s'accumuler au niveau du cytoplasme des cellules et vont être rapidement séquestrés dans des particules RNPs nommées granules de stress (GS).

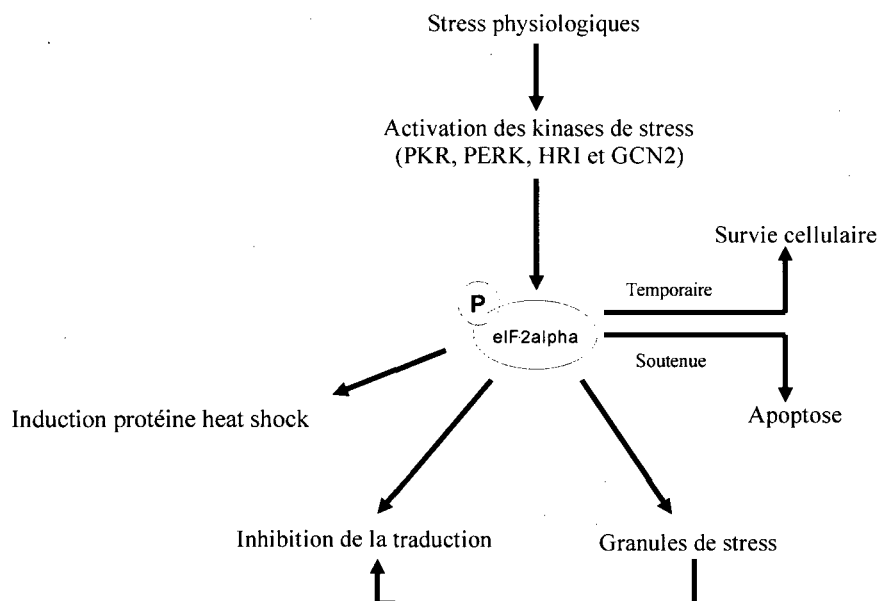


Figure 2 : La réponse au stress cellulaire

Le stress cellulaire active une des voies de signalisation de réponse au stress. Ces différentes voies dépendent du stress cellulaire impliqué et se complètent afin d'assurer la survie cellulaire ou de déclencher l'apoptose. Elles s'initient par l'activation d'une des quatre kinases de stress (PKR, PERK, HRI, GCN2) dépendant du stress cellulaire. Leur auto-activation entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cette phosphorylation inactive eIF2 α , ce qui inhibe la traduction globale et déclenche la formation de granules de stress, sites de stockage et de triage des ARNm non-traduits. La déphosphorylation de eIF2 α par la protéine phosphatase 1 assure la reprise de la traduction et la survie cellulaire lorsque le stress est aboli. Des conditions de stress cellulaires soutenues entraînent une phosphorylation incessante de eIF2 α et ainsi l'apoptose.

Assemblage et composition des GS : Ces GS sont composées d'ARNm non traduits, de la sous-unité ribosomique 40S, de la protéine PABP-1 et de facteurs généraux d'initiation de la traduction comme eIF3, eIF4E et eIF4G. Leur formation est initiée par des protéines pouvant s'auto-agréger, par exemple, les protéines TIA-1 et TIAR (Gilks et al. 2004). Ces protéines possèdent toutes des motifs de reconnaissance à l'ARN en leur domaine N-terminal et en leur extrémité C-terminale, un domaine riche en glutamine structuralement relié au prion responsable de l'agrégation de la protéine (Kawakami et al. 1992, Tian et al. 1991). Le mécanisme de formation des granules de stress implique l'activité de liaison de l'ARNm à ces protéines et la capacité de ces protéines de s'auto-agréger grâce à leur domaine *prion-related*,

piégeant ainsi de nombreux ARNm et les complexes d'initiation de la traduction qui y sont associés (Gilks et al. 2004). La formation des GS peut être aussi activée par une voie indépendante de la phosphorylation du facteur eIF2 α (Dang et al. 2006, Mazroui et al. 2006). Il est donc probable qu'il existe des protéines intermédiaires entre le facteur eIF2 α et les protéines TIA-1/TIAR ou encore qu'il y a une autre voie complètement indépendante. De plus, l'intégrité du réseau de microtubule est nécessaire pour l'assemblage des GS (Ivanov et al. 2003a, Ivanov et al. 2003b). Plusieurs autres protéines sont impliquées dans les étapes précoces de la formation des GS, par exemple, la ribonucléase G3BP (Tourriere et al. 2003) et la protéine SMN (survival motor neuron) (Hua and Zhou 2004). D'autres protéines s'associent plus tardivement au GS dont la protéine HuR (Gallouzi et al. 2000), la protéine CPEBP-1, l'hélicase rck/p54 (Wilczynska et al. 2005), la protéine Staufen (Thomas et al. 2005), l'exonucléase XRN-1 (Kedersha et al. 2005) et la protéine du retard mental du X fragile (FMRP) (Kim et al. 2006). Ces granules représentent donc un site de stockage et de triage des ARNm régulant ainsi leur stabilité et leur traduction (Anderson and Kedersha 2006, Kedersha and Anderson 2002, Kedersha et al. 2002, Kedersha et al. 1999, Kimball et al. 2003).

Dynamisme des GS : Les GS sont des structures très dynamiques et régulées. Par exemple, la protéine IAF (apoptosis inducing factor), malgré qu'elle ne se retrouve pas au sein des GS, peut inhiber l'assemblage de ces derniers en modulant le potentiel oxydo-réducteur de la cellule (Cande et al. 2004). De plus, lorsque le stress cellulaire est aboli, il y a désassemblage des GS. Ce processus s'initie par une déphosphorylation de eIF2 α par la protéine phosphatase 1 (PP1c). Les ARNm associés au GS sont alors relargués dans le cytoplasme afin d'y être traduits. Ce processus évite à la cellule d'avoir à synthétiser à nouveau l'ensemble de ses ARNm ce qui nécessiterait un apport énergétique important (Jousse et al. 2003, Latreille and

Larose 2006, Novoa et al. 2001, Novoa et al. 2003). Certaines études montrent que les GS seraient un centre de triage des ARNm et que les ARNm transitent entre les GS, les polysomes et les processing bodies (P-Bodies), décrits ultérieurement (Anderson and Kedersha 2002a, Anderson and Kedersha 2002b, Anderson and Kedersha 2006, Kedersha et al. 2000, Kedersha et al. 2005). Ainsi, les ARNs non traduits vont être soit stabilisés dans les GS ou dégradés au niveau des P-Bodies ou encore libérés pour être traduits au niveau des polysomes.

1.4.2. Processing bodies (P-Bodies ou GW182 bodies)

Les P-bodies, la voie de dégradation 5'→3' des ARNm : Les P-Bodies sont aussi des particules RNPs cytoplasmiques, mais contrairement aux GS, elles sont aussi présentes en absence de stress cellulaire. De plus, il est bien établi que les P-Bodies sont impliqués dans la dégradation 5'→3' des ARNm. La première étape de la dégradation 5'→3' est la déadénylation partielle des ARNm (~110nt) par le complexe Pan2-3, deux poly(A) nucléases. Une deuxième déadénylation se produit afin de raccourcir la queue poly(A) jusqu'à un oligo(A). Cette déadénylation est catalysée par le complexe Ccr4 et Caf1 (Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth 2007, Yamashita et al. 2005, Zheng et al. 2008). Récemment, il a été montré que les quatre poly(A) nucléases sont présentes dans les P-Bodies et aussi qu'elles sont essentielles pour l'assemblage des P-Bodies (Parker and Sheth 2007, Zheng et al. 2008). Après la déadénylation des ARNm, c'est l'étape de l'enlèvement de la coiffe des ARNm. Cette étape est effectuée par le complexe Dcp1a-Dcp2, deux *decapping enzymes* qui sont aussi présentes dans les P-Bodies (Coller and Parker 2004, Cougot et al. 2004, Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2003, van Dijk et al. 2002, Zheng et al. 2008). Ainsi, les ARNm nus peuvent être dégradés 5'→3' par la nucléase XRN1 que l'on retrouve aussi au niveau des P-Bodies (Coller and Parker 2004, Cougot et al. 2004, Eulalio et

al. 2007b, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2003). Donc, le contenu protéique des P-Bodies implique qu'ils ont un rôle dans la dégradation des ARNm (Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth.2007).

Les P-Bodies, les micro-ARNs et les ARNs interférences : Les P-Bodies ne sont pas seulement constitués d'ARNm mais aussi de micro-ARNs (mi-ARNs) et d'ARNs interférences (ARNi) (Chan and Slack 2006, Eulalio et al. 2007b, Jakymiw et al. 2005, Liu et al. 2005a, Liu et al. 2005b, Meister et al. 2005, Parker and Sheth 2007, Pauley et al. 2006, Pillai et al. 2005, Sen and Blau 2005). Les mi-ARNs et les ARNi sont des ARNs d'environ 21 nucléotides impliqués dans la dégradation des ARNm et/ou la répression de la traduction des ARNm selon leur degré d'homologie (Bagga et al. 2005, Filipowicz et al. 2005, Jing et al. 2005, Meister and Tuschl 2004, Rana 2007, Sen and Blau 2006, Valencia-Sanchez et al. 2006, Yekta et al. 2004). De plus, les P-Bodies sont composés de protéines impliquées soit dans la dégradation ou la répression de la traduction des ARNm, comme la protéine GW182, le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Parker and Sheth 2007) et des protéines Argonautes (Behm-Ansmant et al. 2006, Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Jakymiw et al. 2005, Jakymiw et al. 2007, Liu et al. 2005a, Liu et al. 2005b, Parker and Sheth 2007, Sen and Blau 2005). Certaines études montrent une implication du complexe Dcp1-2 dans la voie des mi-ARNs (Behm-Ansmant et al. 2006, Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Parker and Sheth 2007, Rehwinkel et al. 2005). En plus, il est bien établi que la formation de P-Bodies est requise pour le bon fonctionnement de la voie des mi-RNA et ARNi (Hillebrand et al. 2007, Jakymiw et al. 2005, Liu et al. 2005a, Meister et al. 2005) et vice versa (Hillebrand et al. 2007, Jakymiw et al. 2005, Pauley et al. 2006). Ce contenu protéique et d'ARN des P-Bodies leurs attribuent un

rôle dans la régulation de la traduction et de la dégradation des ARNm (Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth 2007).

Les P-Bodies, la dégradation des ARN non-sens et le métabolisme des U snRNA : Les P-Bodies sont composés de plusieurs protéines associées à la voie de la dégradation d'ARNm non matures et non-sens qu'on appelle *non-sense mediated decay RNA surveillance pathway* (NMD). Par exemple, les P-bodies sont composés entre autres des protéines de la famille des SMG et de la famille des UPF qui sont impliquées dans la voie NMD. Ceci lui suggère un rôle dans le contrôle de qualité des ARNm et dans la dégradation d'ARNm aberrants (Durand et al. 2007, Eulalio et al. 2007b, Fukuhara et al. 2005, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2006, Unterholzner and Izaurralde 2004). De plus, le complexe LSm1-7 responsable de l'enlèvement de la coiffe des ARNm aberrants se retrouve au niveau des P-Bodies (Cougot et al. 2004, Eulalio et al. 2007b, Ingelfinger et al. 2002, Parker and Sheth 2007). Il a été aussi démontré que les P-Bodies sont grandement associés avec une autre particule RNP cytoplasmique qu'on nomme U-Bodies (Liu and Gall 2007). Ces U-Bodies sont composés de petits ARNs nucléaires appelés U snRNA et ont un rôle dans la maturation des ARNs, plus spécifiquement dans l'épissage des ARNm (Liu and Gall 2007). Cette association des P-Bodies avec les U-Bodies leurs suggèrent un rôle dans le métabolisme des snRNA. Donc, les P-bodies auraient un rôle dans la régulation de la traduction des ARNm, dans le contrôle de qualité des ARNm, dans la dégradation des ARNm et au niveau du métabolisme des snRNA. Donc, la formation des P-Bodies va grandement influencer la demi-vie des ARNm présents.

Dynamisme et régulation des P-Bodies : Il est bien établi que les P-Bodies sont des granules dynamiques, c'est-à-dire que selon l'environnement cellulaire, la quantité et la grosseur des P-Bodies peuvent varier. Par exemple, au cours du cycle cellulaire (Yang et al. 2004), de stress

cellulaire (Kedersha et al. 2005, Teixeira et al. 2005), de la prolifération cellulaire (Yang et al. 2004), le nombre et la taille des P-bodies augmentent considérablement. D'autres études montrent que l'arrêt du métabolisme des ARNm (Andrei et al. 2005, Cougot et al. 2004, Sheth and Parker 2003) et de l'initiation de la traduction (Bregues et al. 2005, Sheth and Parker 2003, Teixeira et al. 2005) ont les mêmes effets sur les P-Bodies que les processus mentionnés auparavant. Tandis que l'arrêt de la transcription (Kedersha et al. 2005), de la déadénylation des ARNm ou de la phase d'élongation de la traduction diminuent la quantité et la grosseur des P-Bodies (Cougot et al. 2004, Sheth and Parker 2003). De plus, comme mentionné précédemment, les ARNm peuvent transiter entre les GS, les polysomes et les P-Bodies (Anderson and Kedersha 2002a, Anderson and Kedersha 2002b, Anderson and Kedersha 2006, Kedersha et al. 2000, Kedersha et al. 2005, Parker and Sheth 2007). Plusieurs groupes montrent que certaines protéines peuvent être présentes dans plus d'un compartiment cellulaire, par exemple, la protéine TTP, protéine liant les ARNs ayant un motif ARE en 3' non traduit (Eulalio et al. 2007b, Kedersha et al. 2005, Parker and Sheth 2007). D'autres protéines sont également connues pour résider au niveau des GS et des P-Bodies (Anderson and Kedersha 2006, Eulalio et al. 2007b, Kedersha and Anderson 2007, Kedersha et al. 2005, Parker and Sheth 2007).

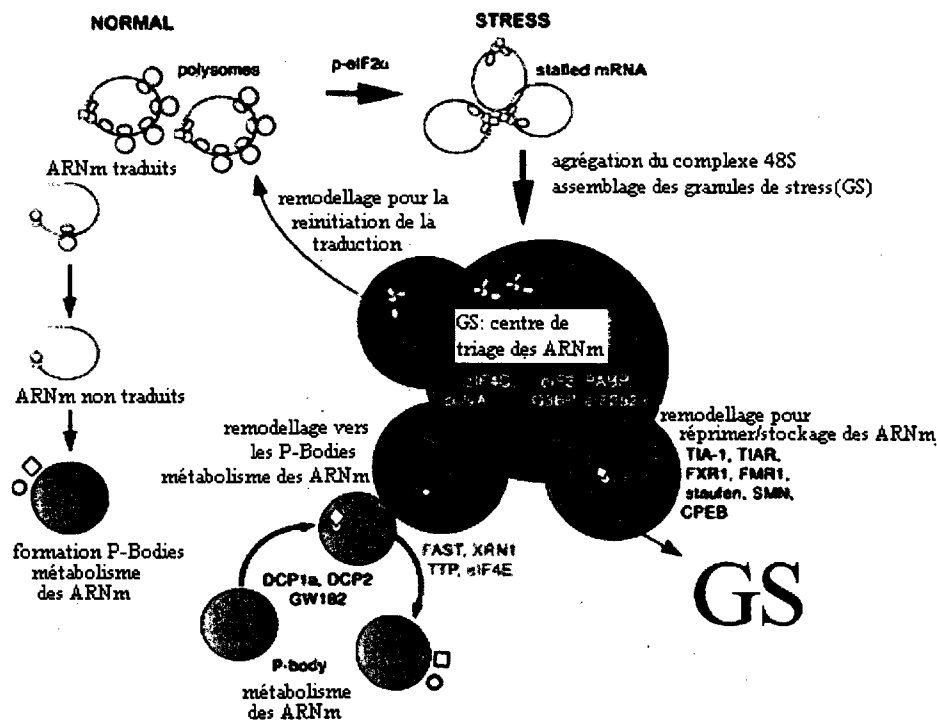


Figure 3 : Dynamisme entre les granules de stress (GS) et les processing bodies (P-Bodies)

En condition physiologique normale, les ARNm sont traduits et ensuite dégradés au niveau des P-bodies, lieux du métabolisme des ARNm (dégradation et répression). En condition de stress cellulaire, l'accumulation du complexe 48S initie l'assemblage des GS par des protéines capables de s'auto-agréger et de lier les ARNm comme les protéines TIA-1 et TIAR. Ainsi, les ARNm vont être soit stabilisés et stockés au niveau des GS ou encore stockés et dégradés au niveau des P-Bodies. Certaines protéines transitent entre les GS et les P-Bodies afin de bien contrôler le métabolisme des ARNm non-traduits. Lorsque le stress est aboli, les ARNm peuvent être relâchés afin d'être traduits au niveau des polysomes. Adaptée de bric.postech.ac.kr/.../foreign_iv/kcib-18.html.

1.4.3. Corps chromatoides

Généralités : Les corps chromatoides (CBs) sont de grosses particules RNPs que l'on retrouve au niveau des cellules germinales, lors de la spermatogénèse et des cellules souches somatiques totipotentes de vers planaires appelées les néoblastes, (Parvinen 2005, Yoshida-Kashikawa et al. 2007). Le CB est aussi nommé nuage et *germ plasm*. Le CB est une particule présente dans le cytoplasme de toutes les cellules germinales au travers du règne animal (Eddy 1975, Saffman and Lasko 1999). Le CB joue un rôle dans la détermination des

cellules germinales animales comme le font les granules polaires chez les insectes (Hegner 1911) ou les *germinal plasm* chez les amphibiens (bounoure 1934). Le CB est aussi une particule dynamique. Il est connu que le CB se déplace dans la cellule de façon parallèle et perpendiculaire au noyau tout en s'approchant de celui-ci (Paniagua et al. 1986, Parvinen 2005, Parvinen and Jokelainen 1974, Toppari and Parvinen 1985). L'actine est possiblement responsable de ce mouvement du CB (Aumuller and Seitz 1988, Walt and Armbruster 1984) avec l'aide de la voie Ca^{2+} -AMPc dépendante (Andonov and Chaldakov 1989, Andonov and Chaldakov 1991, Rouelle-Rossier et al. 1993) et du réseau de microtubule (Andonov 1990, Ventela et al. 2003). Également, il est bien établi qu'il existe une association entre les CBs, les complexes des pores nucléaires et l'enveloppe nucléaire (Fawcett et al. 1970, Parvinen and Parvinen 1979, Soderstrom and Parvinen 1976). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer l'origine des CBs. Certaines études suggèrent qu'ils originent du noyau ou des nucléoles (Comings and Okada 1972, Parvinen and Parvinen 1979, Soderstrom 1978, Soderstrom and Parvinen 1976, Sud 1961a) alors que d'autres croient que les CBs dérivent du matériel intermitochondrial dense lors du stade tardif de pachytène, c'est-à-dire le stade de prophase et de la première méiose de la spermatogénèse (Eddy 1970, Fawcett et al. 1970, Soderstrom 1978).

Le CB et la spermatogénèse : La formation du CB s'initie par la formation de petites particules denses aux électrons ($0,5\mu\text{m}$) distribuées dans le cytoplasme des spermatocytes secondaires. Ces particules denses sont associées avec les mitochondries. Par la suite, ces particules se concentrent afin de former définitivement le CB et celui-ci demeurera présent jusqu'à la formation des spermatides en élongation (Russell and Frank 1978). Lors de la formation des spermatides allongés, le CB se dissocie en corps résiduels (Breucker et al. 1985), ce qui lui implique un rôle dans la régulation de la spermatogénèse. En plus, il est bien

établi qu'il y a une grande régulation de la transcription et la traduction au niveau des spermatides. Par exemple, lors des premiers stades des spermatides (stade 1-8), la synthèse d'ARNm se fait activement, cependant après le stade 8, la transcription est inhibée. Il a été démontré que le CB séquestre les ARNm nouvellement synthétisés lors des premiers stades (1-8) et lorsque la synthèse des ARNm est inhibée après le stade 8, le CB disparaît. Ceci implique que le CB aurait une fonction au niveau de la régulation des phases tardives de la spermatogénèse (Soderstrom and Parvinen 1976). De plus, la composition protéique du CB n'est pas statique, il existe un grand dynamisme au sein du CB. Par exemple, les CBs sont composés entre autres, de la large sous-unité ribosomique P1/P2 essentiellement dans les stades tardifs de la spermatogénèse lorsque l'activité nucléaire des spermatides commence à diminuer (Biggiogera et al. 1990). Il y a aussi l'ARNm de TP2 qui se localise dans le CB seulement au niveau du stade 7 des spermatides (Saunders et al. 1992). Les auteurs de ces dernières études suggèrent que le CB serait une source d'ARNm ou serait un lieu de maturation des précurseurs essentiels aux stades tardifs de la spermatogénèse (Biggiogera et al. 1990, Moussa et al. 1994, Oko et al. 1996, Saunders et al. 1992).

Le CB et les cellules souches totipotentes : Chez les néoblastes, il est bien établi que les CBs diminuent en termes de grosseur et de quantité durant la cytodifférentiation et disparaissent au niveau des cellules complètement différenciées lors de la régénération cellulaire. Ceci suggère que le CB aurait un rôle au niveau du maintien du phénotype de cellules souches totipotentes ou pluripotentes (Parvinen 2005, Shibata et al. 1999) et au niveau de la détermination et la différenciation cellulaire (Parvinen 2005, Sato et al. 2001, Shibata et al. 1999).

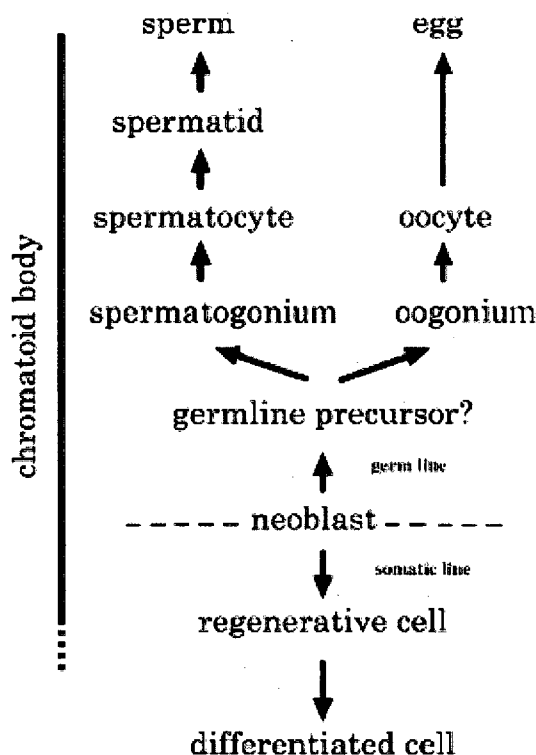


Figure 4 Schéma de l'implication du corps chromatoïde dans la cytodifférentiation des néoblastes et des cellules germinales de vers planaires

Le corps chromatoïde se retrouve non seulement au niveau des cellules germinales chez les vers planaires mais aussi au niveau des cellules souches totipotentes appelées néoblastes. Ceux-ci ont la caractéristique d'être pluripotentes et peuvent se différencier autant en cellules germinales qu'en cellules souches somatiques. Au niveau des cellules souches somatiques, le CB se retrouve non seulement au sein de ces cellules, mais aussi au niveau des cellules souches déterminées et régénératives. Cependant, lors de la différenciation des cellules souches déterminées, le CB disparaît. Adaptée de (Shibata et al. 1999).

Le CB et la protéine MVH : Une des protéines essentielles pour la formation des CBs est la protéine VASA chez la drosophile et ses homologues. Ces protéines sont des DEAD Box ARN hélicase (Hay et al. 1988, Lasko and Ashburner 1988, Liang et al. 1994). La protéine VASA est requise pour le transport cellule à oocyte de plusieurs ARNm critiques pour le bon développement des oocytes (Styhler et al. 1998). De plus, la protéine VASA est aussi requise pour la traduction de plusieurs protéines essentielles pour l'oogenèse. Elle serait donc potentiellement impliquée dans le contrôle de la traduction (Carrera et al. 2000). Chez la

souris, son homologue est la protéine MVH qu'on retrouve seulement au niveau des cellules germinales du tube séminifère chez les adultes. MVH est une protéine cytoplasmique et se retrouve plus précisément au sein du CB chez les spermatides (Noce et al. 2001, Toyooka et al. 2000). La protéine MVH est essentielle pour une reproduction efficace et plus particulièrement essentielle à la spermatogenèse (Tanaka et al. 2000). Il a été démontré que MVH interagit avec la protéine RanBMP, protéine impliquée dans la nucléation des microtubules. RanBMP est exprimée au niveau de l'épithélium séminifère plus spécifiquement dans les spermatocytes matures. Le complexe protéique MVH-RanBMP se retrouve au niveau des complexes périnucléaires ARNs-protéines et des CBs. Cette interaction implique qu'il existe une association fonctionnelle entre la régulation de la traduction et la nucléation des microtubules (Shibata et al. 2004).

Composition des CBs : Les premières études histochimiques suggèrent la présence d'ARN (Eddy 1970, Sud 1961a, Sud 1961b) et de ribonucléoprotéines (Paniagua et al. 1985) au sein du corps chromatoides des spermatides. De plus, la présence de protéines basiques riches en arginines et en polysaccharides au sein du CB a été confirmée (Daoust and Clermont 1955, Krimer and Esponda 1980). Beaucoup d'études démontrent la présence de d'autres types d'ARN que les ARNm (Kotaja et al. 2006a, Saunders et al. 1992) au sein du CB, par exemple, l'ARNr 5S (Figuerola and Burzio 1998) et le petit ARN nucléaire U1 (Moussa et al. 1994), mais l'ARNr 28S et 18S, les ARNt (Figuerola and Burzio 1998) et l'ADN (Biggiogera et al. 1990) sont absents du CB. De plus, comme les P-bodies, les CBs sont composés de mi-ARNs (Kotaja et al. 2006a, Kotaja and Sassone-Corsi 2007) et des protéines qui leurs sont associées comme les protéines de la famille des Argonautes (Kotaja et al. 2006a, Kotaja and Sassone-Corsi 2007) et de la protéine GW182 (Kotaja et al. 2006a, Kotaja and Sassone-Corsi 2007) qui ont un rôle dans la répression et la dégradation des ARNm. Contrairement aux P-Bodies,

les CBs sont aussi composés de la protéine Dicer, impliquée dans la biosynthèse des micro-ARNs (Kotaja et al. 2006a, Kotaja and Sassone-Corsi 2007). Donc, les CBs auraient non seulement un rôle dans la régulation de la traduction et la dégradation des ARNm, mais aussi probablement au niveau de la biogenèse des mi-ARNs. Les CBs sont composés, comme les P-Bodies, de protéines responsable de la dégradation 5'→3' des ARNm comme les protéines XRN1, Dcp1a et les protéines LSm (Bilinski et al. 2004, Kotaja et al. 2006a, Kotaja and Sassone-Corsi 2007, Moussa et al. 1994). Comme mentionnée précédemment, le CB est composé du petit ARN U1 qui se retrouve associé à son complexe protéique LSm. Ces complexes snRNP sont impliqués dans l'épissage alternatif des ARNm (Biggiogera et al. 1990, Kotaja and Sassone-Corsi 2007, Moussa et al. 1994). Le CB jouerait un rôle dans le métabolisme des snARN U et/ou au niveau de l'épissage alternatif de certains transcrits. De plus, les CBs, tout comme les P-Bodies, sont composés de DEAD box ARN hélicases qui sont MVH pour le CB et DDX6 pour les P-Bodies et les GS. Ces protéines régulent le métabolisme des ARNm. Contrairement aux P-Bodies, aucune évidence ne nous démontre que les CBs aurait un rôle dans la dégradation des ARN non-sens puisqu'on ne retrouve aucune protéine associée à cette voie de dégradation. Plusieurs autres protéines constituent le CB, par exemple, la protéine KIF17b responsable du transport de diverses protéines et ARNs composant le CB. KIF17b est une protéine motrice des microtubules transitant entre le noyau et le cytoplasme (Kotaja et al. 2006b, Kotaja and Sassone-Corsi 2007).

Le CB et l'agrésome protéique : Il est bien établi que le CB possède des caractéristiques morphologiques similaires aux agrésomes protéiques. Par exemple, les CB sont localisés au niveau du centrosome, aussi appelé le centre organisationnel des microtubules (MTOC), ils sont entourés d'une cage de vimentine, induisent la co-agrégation des mitochondries et leur formation dépend d'un réseau de microtubules intact. En plus, on retrouve au sein des CB des

protéines ubiquitinylées, des protéines chaperonnes comme Hsp70 et des protéines du protéasome. Certains auteurs proposent que le CB serait en fait un agrésome RNP impliqué dans la régulation du métabolisme des protéines et des ARNs (Haraguchi et al. 2005). En récapitulatif, les études suggèrent plusieurs rôles aux CBs dont la régulation du métabolisme des ARNm, des mi-ARN et des protéines.

1.5. Problématique et hypothèses de recherche

1.5.1. Énoncé de la problématique

Précédemment, nous avons montré que l'agrésome de PrP est en fait une particule poly(A⁺) RNP induisant une réponse au stress inadéquate. Plusieurs particules RNP sont connues comme ayant une implication dans la réponse au stress cellulaire comme les GS et les P-Bodies. Les GS et les P-bodies sont des particules très différentes tant au niveau de leur composition que de leur rôle. Cependant quelques protéines sont connues pour transiter entre les P-bodies et les GS, ce qui suggère qu'il existe une relation entre ceux-ci. Nous avons montré que cette particule RNP-PrP inhibe la formation des GS sans séquestrer les protéines nécessaires à leur formation dont TIA-1, TIAR, Hur et G3BP et inhibe aussi l'induction de l'expression de Hsp70. Nous avons aussi montré que RNP-PrP peut activer la kinase de stress PKR et inhiber ainsi la traduction de la majorité des ARNm. Il existe une autre particule RNP qui est très similaire aux P-bodies qui est appelée les CBs. Ces deux particules ont une composition et des rôles similaires. Les deux entités sont constituées de protéines impliquées dans la voie des mi-ARN, dans la dégradation 5'→3' des ARNm et dans la répression de la traduction des ARNm. Cependant, il y a quelques différences entre les deux particules. Par exemple, dans les CBs, nous retrouvons la protéine Dicer impliquée dans la biogenèse des mi-ARN et des protéines spécifiques à la spermatogenèse comme la protéine MVH. De plus, les CBs sont composés de plusieurs types d'ARN comme l'ARNr 5S et l'ARNsn U1 qui lui sont

spécifiques et suggère que les CBs aient un rôle dans la maturation des ARNs. Donc, ces particules RNP cellulaires possèdent toutes des rôles physiologiques spécifiques mais aucune particule RNP pathologique n'est connue.

1.5.2. Hypothèses et buts

Nous avons voulu approfondir la caractérisation de cette nouvelle particule RNP induite par PrP. Nous avons émis l'hypothèse que l'agrégation des protéines et des ARNs poly(A⁺) étaient interdépendantes et que cette particule induite par PrP posséderait des similarités avec les CBs puisque les deux particules se retrouvent au niveau du centrosome. Nos buts sont de déterminer si 1) les deux phénomènes d'agrégation sont interdépendants, 2) les acides aminés impliqués dans l'agrégation des ARN poly(A⁺), et 3) si la particule RNP induite par PrP possède des similarités avec le CB tant au niveau composition protéique et ARN qu'au niveau cellulaire. De plus, nous avons émis l'hypothèse que cette particule induite par PrP pourrait avoir un rôle physiologique et/ou pathologique.

2. Résultats :

2.1. Avant propos :

Le manuscrit inclus dans ce mémoire est intitulé : **A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body, an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation.** Il a été publié le 30 octobre dans le journal *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. J'ai contribué significativement à la rédaction de l'article et effectué toutes les corrections demandées. Le manuscrit comporte neuf figures, six dont je suis l'unique auteur et j'ai aussi contribué aux trois autres figures.

2.2. Article : A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body, an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation

Simon Beaudoin, Benoît Vanderperre, Catherine Grenier
Isabelle Tremblay, Frederic Leduc, Xavier Roucou

Département de biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke, 3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke, Qc, J1h 5N4, Canada

L'article a été publié dans Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research

Le 30 octobre 2008

Abstract

The observation that PrP is present in the cytosol of some neurons and non-neuronal cells and that the N-terminal signal peptide is slightly inefficient has brought speculations concerning a possible function of the protein in the cytosol. Here, we show that cells expressing a cytosolic form of PrP termed cyPrP display a large juxtannuclear cytoplasmic RNA organelle. Although cyPrP spontaneously forms aggregates, we used several mutants to demonstrate that the assembly of this RNA organelle is independent from cyPrP aggregation. Components of the organelle fall into three classes: mRNAs; proteins, including the RNaseIII family polymerase Dicer, the decapping enzyme Dcp1a, the DEAD-box RNA helicase DDX6, and the small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins SmB/B'/N; and non-coding RNAs, including rRNA 5S, tRNAs, U1 small nuclear RNA, and microRNAs. This composition is similar to RNA granules or chromatoid bodies from germ cells, or planarian stem cells and neurons, which are large ribonucleoprotein complexes predicted to function in RNA processing and posttranscriptional gene regulation. The domain of PrP encompassing residues 30 to 49 is essential for the formation of the RNA particle. Our findings confirm the intriguing relation between PrP and RNA in cells, and underscore an unexpected function for cytosolic PrP: assembling a large RNA processing center which we have termed PrP-RNP for PrP-induced RiboNucleoprotein Particle.

Introduction

Prion diseases are a group of transmissible neurodegenerative disorders including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS) in humans, scrapie in sheep and goat, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and chronic wasting disease (CWD) in deer. A common hallmark of prion diseases is the conversion of the cellular prion protein PrP^C into PrP^{Sc}, a misfolded and proteinase K (PK)-resistant isoform, which is the main component of infectious prions [1-3].

PrP^C is primarily a plasma membrane GPI-anchored glycoprotein localized in specialized domains known as lipid rafts [4]. However, besides the major membrane-bound form, PrP^C may also be found in transmembrane forms [5, 6]. One form, termed ^CtmPrP, has the COOH-terminus in the ER lumen and the NH₂-terminus in the cytosol. The other transmembrane form, termed ^NtmPrP, has the opposite orientation. Both transmembrane forms appear to span the membrane at the same hydrophobic domain comprised between residues 110 and 135 [7]. Interestingly, progressive neurodegeneration both in GSS syndrome patients with an A117V mutation and in transgenic mice carrying a triple mutation within the hydrophobic domain has been shown to coincide with increased synthesis of ^CtmPrP [7, 8].

The presence of PrP^C was also detected in the cytoplasm of different cell types in physiological conditions. PrP^C is present in the cytosol in subpopulations of neurons in the hippocampus, neocortex, and thalamus of mice [9]. PrP^C is abundantly expressed in the cytoplasm of beta-pancreatic cells from rats and its levels increase in response to hyperglycemia or during normal aging [10]. Hypoxia induces the expression of a GPI-anchorless splice variant of PrP located in the cytosol of a human glioblastoma cell line [11]. This cytosolic variant is also detected in human brains and in non-neuronal tissues [11]. Finally, PrP^C is also associated with the sperm cytoplasmic droplets [12]. All together, these results point to a possible role of PrP in the cytoplasm. This hypothesis is supported by the

observation that about 20% of PrP never translocates into the ER due to a particularly inefficient ER translocation signal [13].

Based on previous studies, a cytosolic population of PrP would seem disadvantageous since expression of a recombinant PrP without an ER translocation signal is toxic in transgenic animals [14]. This form of PrP is termed cyPrP for clarity purposes. The toxicity of cyPrP in cultured cells is controversial with studies arguing in favour of a noxious function [13-15], and others against [16-18]. Furthermore, only cerebellar cells appeared to be affected in transgenic mice expressing cyPrP [14], suggesting that toxicity may be cell-type dependent.

Recently, we have shown that cells expressing cyPrP spontaneously form PrP aggresomes [19]. Aggresomes are perinuclear organelles where aggregated proteins are centralised. In contrast to other proteins forming aggresomes in cultured cells, PrP aggresomes specifically induce the co-aggregation of mRNAs [20]. Pull down assays using oligo-dT cellulose showed that cyPrP co-purifies with mRNA, indicating that PrP aggresomes are mRNA ribonucleoprotein complexes. In the present study, we have investigated further the relationship between cyPrP and RNA. In addition to mRNA, cyPrP induced the aggregation of various RNA molecules, including U1 small nuclear RNA, 5S ribosomal RNA, and tRNA. In contrast, the distribution of 18S and 28S rRNAs was unchanged. We mapped the RNA aggregation determinant in the N-terminal unstructured domain of PrP. A C-terminal truncated mutant of cyPrP containing the unstructured region of PrP (residues 23-124) and unable to form aggresomes still induced the assembly of a perinuclear RNA organelle. This RNA organelle shares all characteristics of protein aggresomes, including the assembly of a cage of vimentin surrounding the organelle, its localisation at the centrosome, and the clustering of mitochondria within the organelle. We used several protein and micro-RNA markers to demonstrate that this RNA organelle is similar to chromatoid bodies from germ-cells, and planarians stem cells and neurons. For clarity purposes, this RNA organelle is

termed PrP-RNP for PrP-induced RiboNucleoprotein Particle. These results reveal a possible function for PrP in the cytoplasm: assembling a specific RNA platform for the storing and processing of RNA.

Experimental Procedures

Antibodies, clones, and reagents- Primary antibodies used were monoclonal anti-Dicer (Abcam, clone 13D6), anti-DDX6 (Abcam, polyclonal 40684), anti-Dcp1a (Abnova, clone 3G4), anti-SmB/B'/N (SantaCruz, polyclonal FL-240), and anti-vimentin (Abcam, clone VI-10 or polyclonal 45939). Monoclonal antibody 414 which recognizes five FG-repeat nucleoporins (nup358, nup214/CAN, nup153, nup98, and p62), was purchased from Abcam. Monoclonal SAF32 was purchased from Cayman. Anti-VASA/MVH antibody was a kind gift from Dr Kimmins (McGill University, Montreal, Canada). Secondary antibodies were alexa Fluor 633 or 568 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (Invitrogen).

Cloning of CyPrP^{EGFP}, CyPrP^{EGFP}124stop, and CyPrP^{EGFP}124-230 in pCEP4β (Invitrogen) was described previously [19]. CyPrP50-230 was amplified by PCR using forward 5'-cctctcgagctccacctcagggcggtg-3' and reverse 5'-cgcgatcctcagatcctctctgtaataggcctg-3' primers. The PCR product was introduced in the HindIII and BamHI restriction sites of EGFP-pCEP4β [19], to generate CyPrP^{EGFP}50-230. CyPrP^{EGFP}33-230 was amplified from CyPrP^{EGFP} by PCR using forward 5'-ccaagcttatgaacactggggcagccgatac-3' and reverse 5'-cgcgatcctcagatcctctctgtaataggcctg-3' primers. The PCR product was introduced in the HindIII and BamHI restriction sites of pCEP4β. CyPrP^{EGFP}Δ30-49 was generated from CyPrP^{EGFP} by using the Stratagene Quick Change mutagenesis protocol and the two primers 5'-cgcccgaagcctggaggatggggcaaccgctaccacctcagggc-3' and 5'-gcctgaggtgggtagcggttgcctcctccaggettggcg-3'. Primers were purchased from IDT. All constructs were sequenced in both orientations.

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Cell culture, transfections, squash preparations - Mouse N2a neuroblastoma were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal bovine serum (Wisent). Transfections were carried out using Exgen according to the manufacturer's protocol (MBI Fermentas).

Testes of adult wild-type C57BL/6 mice were decapsulated in PBS and squash preparations of seminiferous tubules were done as described in [21].

Immunoprecipitation and western blotting - Cells (10^6 in 6-well plates) were rinsed twice with 2 ml cold PBS, and lysed with 200 μ l buffer A [50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM KCl; 1% NP-40; 1 mM EDTA; 0.5 mM DTT; 1 mini EDTA-free protease inhibitor tablet (Roche) per 10 ml] for 15 min on ice. The lysate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C. Twenty μ l were kept aside (total input), and the remaining 180 μ l were processed for immunoprecipitation. Protein A/G-PLUS-agarose beads (SantaCruz) were mixed for 2 hr with 10 μ l of anti-vimentin or control isotype antibodies. The antibody-bead mix was then washed with buffer NT2 (50 mM Tris [pH 7.4]; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0.05% Nonidet P-40). Immunoprecipitation was carried out for 12 hr at 4°C. The beads were then washed three times with 1 ml of buffer NT2, and the bound proteins eluted by incubating for 5 min at 95 °C in SDS-PAGE sample buffer [0.5% SDS (w/v), 1.25% 2- β -mercaptoethanol (v/v), 4% glycerol (v/v), 0.01% bromphenol blue (w/v), 15 mM Tris-HCl, pH 6.8]. Proteins were detected by western blot using anti-Dicer (1/100), anti-DDX6 (1/1000), anti-Dcp1a (1/500), and anti-SmB/B'/N (1/200) antibodies.

Immunofluorescence, Fluorescence in situ hybridization - Cells grown on coverslips were fixed and processed for immunofluorescence as previously described [19]. Primary antibodies dilutions were as followed: Dcp1 (1/100), DDX6 (1/100), Dicer (1/100), SmB/B'/N (1/50), VASA/MVH (1/200). Secondary antibodies were diluted 1/1000.

For in situ staining, permeabilized cells were incubated 10 min with $2 \times$ SSC, and hybridized with 1 nM of an end-labeled biotinylated probes overnight at 10°C below the T_m in the hybridization mixture ($2 \times$ SSC, 1mg/ml yeast tRNA, 10% dextran sulphate, 25% formamide). Probes were specific for mRNAs (oligo-dT20), U1 (5'-aaaaccaccttcgtgatcatggtatctcccc-3'), 5S rRNA (5'-tattcccaggcggctctcccatccaagtactaac-3'), 18S rRNA (5'-atatacgtattggagctggaattacc-3'), 28S rRNA (5'-agtgggtgaacaatccaacgcttgg-3'), let-7a (5'-aactatacaacctactactca-3'), miR21 (5'-tcaacatcagctgataagcta-3'), miR122a (5'-caaacaccattgtcacactcca-3'), and tRNA-Leu-CAG (5'-aagtcagcgtcagagggga-3'). tRNA-Leu-CAG was chosen because it is the most abundant in cells. All of the probes were purchased from IDT. After washing twice with $2 \times$ SSC and once with $0.5 \times$ SSC, cells were equilibrated in $1 \times$ PBS containing 1 mg/ml BSA. Cells were incubated with 2 $\mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor 633-labeled streptavidin (Molecular Probes) in $1 \times$ PBS containing 1 mg/ml BSA. After a 1 h incubation, cells were washed and mounted as previously described [10].

In the in situ staining protocol of squash preparations, the hybridization mixture contained 0.2mg/ml BSA.

Microscopy - For epifluorescence analysis, cells were examined with an Eclipse TE2000-E visible/epifluorescence inverted microscope (Nikon Corporation, Japan) equipped with band pass filters for fluorescence of Hoechst (Ex. D340/40: Em. D420), GFP (Ex. D450/40: Em. D500/50) and tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) (Ex. D528/25 : Em. D590/60) (Nikon Corporation). Photomicrographs of 1344 x 1024 pixels were captured using either 60x or 100x oil immersion objectives and Orca cooled color digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan). Images were processed using NIS Elements AR software (Nikon Corporation). Within the same figure, all pictures were taken with the same exposure time.

For confocal analysis, cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to an inverted microscope with a 63x oil immersion

objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 488 nm (40 mW Argon laser) and 633 nm (Helium-Neon laser). In order to avoid cross-talk between the emitted EGFP and Alexa Fluor 633 fluorescences were collected sequentially at wavelengths 525-550 and >590 nm respectively. Serial horizontal optical sections of 512x512 pixels with 2 times line averaging were taken at 0.11 μm intervals through the entire thickness of the cell (optical resolution: lateral - 0.18 μm ; axial - 0.25 μm). Images were acquired during the same day, typically from 5 cells of similar size from each experimental condition using identical settings of the instrument. For illustration purposes images were pseudocolored according to their original fluorochromes, merged (FluoView software, Olympus), then cropped and assembled (Adobe Photoshop software, Adobe Systems, Mountain View, CA).

Results

Co-aggregation of 5S, U1, tRNA but not 18S and 28S with PrP aggresomes

The observation that mRNAs aggregate with PrP aggresomes prompted us to investigate the specificity of this co-aggregation [20]. We performed fluorescence in situ hybridization (FISH) using probes specific for various RNA molecules, including ribosomal 5S, 18S, and 28S RNAs, the small nuclear U1 RNA, and tRNAs. Fluorescent PrP aggresomes were reconstituted by expressing cyPrP^{EGFP} in murine neuroblastoma N2a cells [19, 20]. The analysis on N2a cells expressing cyPrP^{EGFP} revealed a concentration of mRNA, 5S, U1, and tRNA with PrP aggresomes (Fig 1A-D). In contrast, 18S and 28S rRNAs did not co-aggregate with PrP aggresomes, but remained diffuse in the cytoplasm and the nucleoli (Fig. 1E-F). Previously, we showed that aggregation of mRNAs was specific to PrP aggresomes since the aggresome-forming protein GFP-250 used as a model to study the dynamics of protein aggresomes did not display any mRNA clustering activity [20] (Fig. 1A). Similarly, aggregation of 5S, U1, and tRNA was specific to PrP aggresomes since GFP-250 did not

modify their intracellular distribution (Fig 1B-D). As expected, the formation of GFP-250 aggresomes did not alter the distribution of 18S and 28S rRNAs (Fig. 1E-F). These results indicate that several but not all RNA molecules co-aggregate specifically with PrP aggresomes.

Cytosolic PrP can induce the aggregation of RNA independently of the formation of aggresomes

CyPrP^{EGFP} co-purifies with mRNAs in oligo-dT cellulose pull down assays, strongly suggesting that PrP aggresomes are in fact poly(A)⁺ ribonucleoprotein complexes [20]. This hypothesis predicts that aggregation of cyPrP^{EGFP} should be essential for the assembly of ribonucleoprotein complexes. In order to address this issue, we used a mutant unable to form aggresomes, cyPrP^{EGFP}124stop [19]. This mutant contains the unstructured N-terminus of PrP (residues 23-124). Strikingly, mRNAs still assembled in a large juxtannuclear organelle in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop (Fig 1A). This observation was confirmed with probes specific to 5S, U1, and tRNAs (Fig B-D). Similar to cyPrP^{EGFP}, 18S and 28S rRNAs did not aggregate in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop (Fig. 1E-F).

In additional experiments, we expressed CyPrP^{EGFP}124-230, a protein construct representing the C-terminal structured domain of PrP which forms aggresomes [19]. As expected, cells expressing cyPrP^{EGFP}124-230 assembled aggresomes; however, cyPrP^{EGFP}124-230 aggresomes did not modify the distribution of RNAs (Fig. 1). Thus, aggregation of mRNAs, 5S rRNA and U1 snRNA is independent from the aggregation of cyPrP. In addition, residues responsible for the formation of this RNA organelle lie in the N-terminal domain of cyPrP.

Since the aggregation of cyPrP is not essential for the assembly of the RNA organelle and that this organelle also contains proteins (below), we termed this organelle PrP-induced ribonucleoprotein particle or PrP-RNP. Several deletion mutants containing the C-terminal

domain and thus capable of forming protein aggresomes were engineered to precisely map the domain of PrP in the N-terminal region that signals the formation of PrP-RNPs (Fig 2). PrP-RNPs were not formed in cells expressing CyPrP^{EGFP}50-230 but assembled in cells expressing CyPrP^{EGFP}33-230, indicating that the aggregation determinant of PrP-RNPs was located between residues 33 and 50. This was confirmed by expressing CyPrP^{EGFP}Δ30-49, a deletion mutant missing a domain located between residues 30 to 49. This mutant was not able to induce the formation of PrP-RNP (Fig 2).

PrP-RNPs share structural and functional criteria similar to protein aggresomes

PrP-RNPs, like protein aggresomes, assemble in a juxtannuclear area. One possibility to explain this observation would be that these RNA organelles are in fact RNA-containing aggresomes. To test this hypothesis, we examined four main features of protein aggresomes in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop; localization of PrP-RNPs around the microtubule organising center or centrosome, assembly of a cage of vimentin around PrP-RNPs, clustering of mitochondria, and the requirement for an intact microtubule network for their assembly [22]. As shown in figures 3A and 3B, PrP-RNPs also localized around γ -tubulin, a component of the centrosome, and were surrounded by a cage composed of vimentin protein. Furthermore, a major rearrangement of the mitochondrial network occurred in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop. Mitochondria, which are normally distributed throughout the cytoplasm were clustered around PrP-RNPs, leaving no detectable mitochondria in other regions of the cytoplasm (Fig 3C). We also tested the effect of the microtubule-depolymerising agent nocodazole. Nocodazole completely prevented the formation of PrP-RNPs (Fig. 3D). Thus, besides cytological criteria examined above, PrP-RNPs also share functional features with protein aggresomes.

PrP-RNPs and RNA granules from germ cells or planarian stem cells and neurons share similar components

To our knowledge, the only known cytoplasmic bulky RNA particle described in the literature are large, nonmembranous, RNA-rich organelles typically found around the nuclei of germ cells, planarian stem cells and neurons [23, 24]. Germ granules are also known under the name of chromatoid bodies [25]. Similar to PrP-RNPs, chromatoid bodies contain mRNAs, 5S rRNA and U1 snRNPs [26, 27]. They also display aggresomal characteristics, including a cage of vimentin surrounding the RNA granule [28]. mRNA is the only RNA molecule that has been detected by FISH in chromatoid bodies; the presence of 5S was detected by electrophoretic analysis of RNA extracted from chromatoid bodies, and the presence of 18S and 28S was not sought [26]. Furthermore, the presence of U1 was indirectly detected using anti-U1 snRNP antibodies [27]. In order to compare the RNA composition of PrP-RNPs and chromatoid bodies, we performed FISH experiments on squash preparations of mouse seminiferous tubules. The ATP-dependent DEAD-box RNA helicase VASA/MVH was used as a specific marker for the chromatoid body [29, 30]. The chromatoid body was labelled with poly(A⁺), 5S and U1 probes (Fig. 4A-C). In contrast, there was no concentration of 18S and 28S rRNAs in the chromatoid body (Fig. 4D-E). Interestingly, tRNAs were also concentrated in chromatoid bodies although some tRNA remained distributed throughout the cytoplasm (Fig 4F).

These data motivated us to further analyze a possible relationship between chromatoid bodies and PrP-RNPs. Recently, several miRNAs were shown to concentrate in chromatoid bodies, including miR-122a, miR-21, and let-7a [30]. The distribution of these miRNAs was determined by FISH using specific oligonucleotide probes in cells expressing cyPrP^{EGFP} and cyPrP^{EGFP}124stop. In agreement with previous studies, miRNAs were mostly located throughout the cytoplasm in control untransfected cells (Fig. 5) [31, 32]. The analysis on cells

expressing cyPrP^{EGFP} revealed a high concentration of miR-122a, miR-21, and let-7a within PrP-RNPs. miRNAs also concentrated in a juxtannuclear area in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop (Fig. 5).

Chromatoid bodies are also characterized by the accumulation of a specific set of proteins [25]. Here, four different protein markers were investigated in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop. Similar results were obtained in cells expressing cyPrP^{EGFP} (not shown). First, the mRNAs decapping Dcp1a enzyme is a component of RNA processing bodies or P-bodies and has normally a granular cytoplasmic localization [33]. Interestingly, Dcp1a concentrates in chromatoid bodies, indicating a functional analogy with P-bodies [30]. The granular distribution of Dcp1a was confirmed in mock-transfected cells (Fig. 6A). In sharp contrast, Dcp1a concentrates in PrP-RNPs (Fig. 6B). Second, the DEAD box-family RNA helicase VASA/MVH is a classical marker of chromatoid bodies [29, 30]. VASA/MVH is specific to germinal cells and could not be detected in N2a cells (not shown). We determined if DDX6, a more ubiquitous DEAD box RNA helicase generally present in messenger ribonucleoprotein particles including P-bodies and stress granules could concentrate in PrP-RNPs [34, 35]. Indeed, DDX6 accumulated in PrP-RNPs in cells expressing cyPrP^{EGFP}124stop (Fig. 6C-D). Third, Dicer, a double-stranded RNaseIII essential for RNA interference and the biogenesis of miRNAs was recently detected in chromatoid bodies [30]. It was suggested that chromatoid bodies may participate in the posttranscriptional control of gene expression through the small RNAs pathway [30]. Remarkably, we also found Dicer associated with PrP-RNPs (Fig. 6E-F). Finally, Sm proteins are essential core components of small nuclear ribonucleoprotein particles present in the spliceosome. Sm proteins are central to RNA metabolism, and are involved in diverse processes such as pre-mRNA splicing and telomere formation. Sm proteins also localize to the chromatoid body [27, 36]. Using an

antibody recognizing the three Sm proteins B/B'/N, Sm proteins were also detected in PrP-RNPs (Fig. 6G-H).

In a control experiment, we verified that the concentration of proteins in PrP-RNPs is not a general phenomenon. Previously, we have shown that ribosomal protein S6 did not co-aggregate with mRNA in cyPrP^{EGFP} aggresomes [20]. Ribosomal protein S6 does not coalesce in PrP-RNPs either but remains distributed throughout the cytoplasm (Fig. 6I-J).

PrP-RNPs and nuclear pore complexes

One important feature of chromatoid bodies is their frequent contacts with nuclear pore complexes [37]. In some instances, material continuities between intranuclear dense particles and chromatoid bodies are revealed by electron microscopy. In order to verify the relationship between nuclear pore complexes and PrP-RNPs, nuclear pores were immunostained using antibodies against FXFG repeat nucleoporins, which are positioned throughout the pore complexes. Indirect immunofluorescence images combined with FISH with an oligo-dT probe confirmed the proximity between PrP-RNPs and the nuclear envelope in cells expressing cyPrP^{EGFP} or cyPrP^{EGFP}124stop (Fig 7A). Furthermore, similar to chromatoid bodies, some FXFG repeat nucleoporins were also present in PrP-RNPs (Fig 7A).

An important characteristic of the chromatoid body is its movements along and perpendicular to the nuclear envelope [37]. PrP-RNPs were mainly detected close to the nuclear pore complexes, but were also detected at a variable distance from the nuclear envelope (compare Fig 7A and 7B).

Association between vimentin and protein components of PrP-RNPs

To biochemically confirm the assembly of PrP-RNPs, we attempted to affinity-purify protein components of this organelle using vimentin antibody-coated protein A/G sepharose beads.

Immunoprecipitates from cells expressing cyPrP^{EGFP} or cyPrP^{EGFP}124stop contained Dcp1a, DDX6, Dicer, and Sm (Fig 8, lanes 6, 10). In contrast, these proteins did not purify with anti-vimentin antibodies in mock-transfected cells, confirming the specificity of this association in cells with PrP-RNPs (Fig 8, lane 3). We consistently observed some association between vimentin and Dcp1a. However, this association was largely increased in cells expressing cyPrP^{EGFP} or cyPrP^{EGFP}124stop (Fig 8). Isotype control antibody did not immunoprecipitate Dcp1a, DDX6, Dicer, and SmB/B'/N, again confirming the specificity of this interaction (Fig 8, lanes 5, 8). Furthermore, anti-vimentin antibodies did not purify Dcp1a, DDX6, Dicer, and SmB/B'/N in cells expressing CyPrP^{EGFP}124-230 (lanes 11-13), or GFP-250 (14-16).

PrP is detected in the cytoplasm of mouse germ cells displaying a chromatoid body

Chromatoid bodies are absent in spermatocytes before the second meiosis of spermatogenesis, and are visible in round spermatids during the haploid phase of spermatogenesis [37]. They disappear with the residual body during late spermatogenesis. In order to test the hypothesis that endogenous PrP may be present in the cytoplasm of round spermatids, we analyzed the distribution of PrP in germ cells before the second meiosis and during the haploid phase in squash preparations of mouse seminiferous tubules (Fig 9). PrP is mainly located at the plasma membrane in spermatocytes (Fig 9A). In contrast, PrP has a cytoplasmic distribution in round spermatids containing a chromatoid body (Fig. 9B).

Discussion

The presence of PrP in the cytosol has been detected in a subpopulation of neurons and in beta-pancreatic cells [9, 10]. A recent study described a new GPI-anchorless splice variant of the prion protein in human brain and non-neuronal tissues [11]. Interestingly, this variant is located in the cytosol and its levels increase in hypoxic conditions in a human glioblastoma

cell line. Altogether, these results point to a possible function of PrP in the cytoplasm. Yet, whether PrP has a specific function in this location and what this function might be has remained elusive. Our findings support a scenario where cyPrP induces the assembly of an RNA processing center similar to RNA granules termed chromatoid bodies.

cyPrP induces the assembly of a large ribonucleoprotein particle termed PrP-RNP

An important result of this study is the observation that cyPrP induces the formation of an RNA organelle termed PrP-RNP. We have also observed PrP-RNPs in several neuronal and non-neuronal cells from murine and human origin. In this manuscript, only results obtained in N2a cells are shown for clarity reasons. The composition of PrP-RNPs is not specific to one class of RNA but includes several types of RNA molecules. These results seem to be in accordance with previous *in vitro* studies describing the nucleic-acid binding activity of recombinant PrP [40]. If co-aggregation of cyPrP and RNA is a consequence of a direct interaction between these two macromolecules, a strict correlation should be expected between cyPrP aggregation and the assembly of PrP-RNPs. Hence, aggregation of cyPrP should be essential for the assembly of PrP-RNPs. However, expression of several deletion mutants demonstrates that aggregation of cyPrP and RNA can be uncoupled. Similar to PrP aggresomes, PrP-RNPs induced by a cyPrP mutant unable to aggregate deposit at the centrosome, are surrounded by a cage of vimentin, and their assembly is dependent on a functional microtubule network. Thus, cyPrP and PrP-RNPs co-aggregate for the reason that they utilize the same aggresomal pathway.

These results are significant in terms of the molecular activity of cyPrP. They show that in the cytosol, PrP activates an aggresomal pathway responsible for the biogenesis of PrP-RNPs. This activity is independent from cyPrP aggregation and therefore, does not require a direct contact between cyPrP and RNA in the PrP-RNP. However, the possibility that an interaction

between cyPrP and a specific RNA molecule may be responsible for the induction of PrP-RNPs cannot be ruled out. In favour of this hypothesis, the domain involved in the assembly of PrP-RNPs is located between residues 30 to 50; interestingly, this domain also binds RNA in vitro [41].

PrP-RNPs are similar to chromatoid bodies

Although several types of RNAs concentrate in PrP-RNPs, the observation that cyPrP does not modify the distribution of 18S and 28S rRNAs indicates some specificity and regulation in the mechanism of assembly of PrP-RNPs. Several lines of evidence suggest that PrP-RNPs are similar to previously described RNA granules also known as chromatoid bodies from germ cells, or from planarian stem cells and neurons [25, 36]. First, both organelles concentrate identical RNA molecules. We used FISH to confirm the presence of mRNA, snU1RNA, 5S rRNA, and several miRNAs in spermatid cells and in PrP-RNPs. We could also detect tRNAs in these RNA granules. Second, proteins involved in different steps of the metabolism of RNA and that accumulate in chromatoid bodies also concentrate in PrP-RNPs. Third, like chromatoid bodies, PrP-RNPs share similar aggresomal characteristics. Fourth, similar to chromatoid bodies, PrP-RNPs are proximal to nucleoporins. Fifth, endogenous PrP is present in the cytoplasm of round spermatids containing chromatoid bodies. Despite these characteristics, the possibility that PrP-RNPs and chromatoid bodies are different organelles cannot be completely excluded.

It has become generally accepted that assembly of the chromatoid body constitutes a mechanism of centralizing the post-transcriptional processing and storage of various RNA species [42]. Yet, its specific function has remained elusive for decades. One possible function is related to the pluripotency of stem cells and germ cells. Planarians are notorious for their strong regenerative ability. This exceptional property is considered to reside in

specific stem cells termed neoblast that contain a chromatoid body [24]. The chromatoid body is also predicted to give germ cells the ability to differentiate while maintaining a totipotent genome [25]. Interestingly, PrP is a marker for hematopoietic stem cells and supports their self-renewal [43]. In addition, PrP positively regulates the proliferation of neural precursors during developmental and adult mammalian neurogenesis [44]. It would be interesting to determine if this proliferation activity of PrP depends on the formation of PrP-RNPs.

PrP-RNPs, like chromatoid bodies share components with cytoplasmic foci termed P bodies where untranslated mRNAs accumulate, awaiting translational reactivation or degradation (Anderson and Kedersha, 2006; Seydoux and Braun, 2006). These components include Dcp1a, and microRNAs. A complete list of molecules for any of these granules is not yet available. Such a list would be essential to determine the relationship between these RNA granules. Although these RNA granules may have a very similar composition, the juxtenuclear localization of PrP-RNPs and chromatoid bodies is specific. Thus, the function of PrP-RNPs and chromatoid bodies is also likely different from the function of P bodies.

PrP and the RNA connection

It is well established that PrP has nucleic-acid binding activity in vitro [45]. In some instances, PrP exhibits RNA chaperone properties similar to the nucleoprotein NCP7 of HIV-1, and to the nucleoprotein of feline immunodeficiency virus [46, 47]. Reciprocally, binding of recombinant or purified PrP to RNA in vitro induces profound conformational rearrangements and results in a protease-K resistant (PrP^{Res}) isoform [48-51]. Furthermore, RNA molecules co-localize with large extracellular hamster prions aggregates in infected hamsters [52]. Thus, it is tempting to propose that interactions between RNA and PrP may be a facilitating if not an essential factor in the conversion of PrP into PrP^{Res}.

Our results reveal a novel dimension in the relation between PrP and RNA in vivo. Indeed, a simple interaction of PrP with mRNAs, 5S rRNA, U1 snRNA, tRNA, and several miRNAs, but not with 18S and 28S rRNAs would hardly explain how these RNAs and several proteins involved in the life and death of RNA are specifically concentrated in a large ribonucleoprotein particle. We suggest that a new signalling mechanism between PrP and RNA remains to be discovered.

In summary, the discovery of PrP-RNPs should prove to be extremely useful for better understanding the biological relevance of cytoplasmic PrP.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Leonid Volkov for his expertise with confocal microscopy, and Dr Guylain Boissonneault for sharing with us his expertise in spermatogenesis. We also thank Dr Elisabeth Sztul (University of Alabama at Birmingham, AL USA) for providing the construct encoding GFP-250.

REFERENCES

- [1] S.B. Prusiner, Prions, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 13363-13383.
- [2] J. Collinge, Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis, Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001) 519-550.
- [3] A. Aguzzi, M. Polymenidou, Mammalian prion biology: one century of evolving concepts, Cell 116 (2004) 313-327.
- [4] M. Vey, S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S.J. DeArmond, E.J. Smart, R.G. Anderson, A. Taraboulos, S.B. Prusiner, Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains, Proc Natl Acad Sci U S A. 93 (1996) 14945-14949.

- [5]C.S. Yost, C.D. Lopez, S.B. Prusiner, R.M. Myers, V.R. Lingappa, Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein, *Nature* 343 (1990) 669–672.
- [6]C.D. Lopez, C.S. Yost, S.B. Prusiner, R.M. Myers, V.R. Lingappa, Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis, *Science* 248 (1990) 226–229.
- [7]R.S. Hegde, J.A. Mastrianni, M.R. Scott, K.A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, V.R. Lingappa, A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease, *Science* 279 (1998) 827–834.
- [8]R.S. Stewart, P. Piccardo, B. Ghetti, D.A. Harris, Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein, *J. Neurosci.* 25 (2005) 3469–3477.
- [9]A.Jr. Mirónov, D. Latawiec, H. Wille, E. Bouzamondo-Bernstein, G. Legname, R.A. Williamson, D. Burton, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, P.J. Peters, Cytosolic prion protein in neurons, *J. Neurosci.* 23 (2003) 7183–7193.
- [10]A. Strom, G.S. Wang, R. Reimer, D.T. Finegood, F.W. Scott, Pronounced cytosolic aggregation of cellular prion protein in pancreatic beta-cells in response to hyperglycemia, *Lab Invest.* 87 (2007) 139-149.
- [11]Y. Kikuchi, T. Takeya, O. Nakajima, A. Sakai, K. Ikeda, N. Yamaguchi, T. Yamazaki, K.I. Tanamoto, H. Matsuda, J.I. Sawada, K. Takatori, Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein, *FEBS J.* (2008) In press.
- [12]H. Ecroyd, P. Sarradin, J.L. Dacheux, J.L. Gatti, Compartmentalization of prion isoforms within the reproductive tract of the ram, *Biol Reprod.* 71 (2004) 993-1001.
- [13]N.S. Rane, J.L. Yonkovich, R.S. Hegde, Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation, *EMBO J.* 23 (2004) 4550-4559.

- [14]J. Ma, R. Wollmann, S. Lindquist, Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol, *Science* 298 (2002) 1781-1785
- [15]A.S. Rambold, M. Miesbauer, D. Rapaport, T. Bartke, M. Baier, K.F. Winklhofer, J. Tatzelt, Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP, *Mol Biol Cell*. 18 (2006) 3356-3368.
- [16]X. Roucou, Q. Guo, Y. Zhang, C.G. Goodyer, A.C. LeBlanc, Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons, *J Biol Chem*. 278 (2003) 40877-40881.
- [17]L. Fioriti, S. Dossena, L.R. Stewart, R.S. Stewart, D.A. Harris, G. Forloni, R. Chiesa, Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations, *J Biol Chem*. 280 (2005) 11320-11328.
- [18]J. Jodoin, S. Laroche-Pierre, C.G. Goodyer, A.C. LeBlanc, Defective retrotranslocation causes loss of anti-Bax function in human familial prion protein mutants, *J Neurosci*. 27 (2007) 5081-5091.
- [19]C. Grenier, C. Bissonnette, L. Volkov, X. Roucou, Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells, *J Neurochem*. 97 (2006) 1456-1466.
- [20]K. Goggin, S. Beaudoin, C. Grenier, A.A. Brown, X. Roucou, Prion protein aggregates are poly(A)(+) ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response, *Biochim Biophys Acta*. 1783 (2008) 479-491.
- [21]N. Kotaja, S. Kimmins, S. Brancorsini, D. Hentsch, J.L. Vonesch, I. Davidson, M. Parvinen, P. Sassone-Corsi, Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis, *Nat Methods*. 1 (2004) 249-254.
- [22]J.A. Johnston, C.L. Ward, R.R. Kopito, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins, *J. Cell Biol*. 143 (1998) 1883-1898.

- [23]N. Shibata, Y. Umesono, H. Orii, T. Sakurai, K. Watanabe, K. Agata, Expression of VASA(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians, *Dev Biol.* 206 (1999) 73-87.
- [24]M. Yoshida-Kashikawa, N. Shibata, K. Takechi, K. Agata, DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons, *Dev Dyn.* 236 (2007) 3436-3450.
- [25]G. Seydoux, R.E. Braun, Pathway to totipotency: lessons from germ cells, *Cell* 127 (2006) 891-904.
- [26]J. Figueroa, L.O. Burzio, Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids, *Cell and Tissue Research* 291 (1998) 575– 579.
- [27] F. Moussa, R. Oko, L. Hermo, The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat, *Cell Tissue Res* 278 (1994) 363-378.
- [28] C.M. Haraguchi, T. Mabuchi, S. Hirata, T. Shoda, K. Hoshi, K. Akasaki, S. Yokota, Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells, *J Histochem Cytochem.* 53 (2005) 455-465.
- [29]Y. Toyooka, N. Tsunekawa, Y. Takahashi, Y. Matsui, M. Satoh, T. Noce, Expression and intracellular localization of mouse VASA-homologue protein during germ cell development, *Mech Dev.* 93 (2000) 139-149.
- [30]N. Kotaja, S.N. Bhattacharyya, L. Jaskiewicz, S. Kimmins, M. Parvinen, W. Filipowicz, P. Sassone-Corsi, The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 2647-2652.
- [31]H.W. Hwang, E.A. Wentzel, J.T. Mendell, A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import, *Science* 315 (2007) 97-100.

- [32]X.M. Chen, P.L. Splinter, S.P. O'Hara, N.F. LaRusso, A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection, *J Biol Chem* 282 (2007) 28929-28938.
- [33]N. Kedersha, G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fritzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, P. Anderson, Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodelling, *J Cell Biol.* 169 (2005) 871-884.
- [34]N. Cougot, S. Babajkó, B. Seraphin, Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells, *J. Cell Biol* 165 (2004) 31-40.
- [35]A. Wilczynska, C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry, D. Weil, The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules, *J. Cell Sci* 118 (2005) 981-992.
- [36]S. Chuma, M. Hiyoshi, A. Yamamoto, M. Hosokawa, K. Takamune, N. Nakatsuji, Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs, *Mech Dev.* 120 (2003) 979-990.
- [37]M. Parvinen, The chromatoid body in spermatogenesis, *Int J Androl.* 28 (2005) 189-201.
- [38]Y. Yedidia, L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, A. Taraboulos, Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein, *EMBO J* 20 (2001) 5383-5391.
- [39]J. Ma, S. Lindquist, Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol, *Science* 298 (2002) 1785-1788
- [40]J.L. Silva, L.M. Lima, D. Foguel, Y. Cordeiro, Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein, *Trends Biochem Sci.* 33 (2008) 132-40.
- [40]S. Weiss, D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok, E.L. Winnacker, RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP, *J Virol.* 71 (1997) 8790-8797.

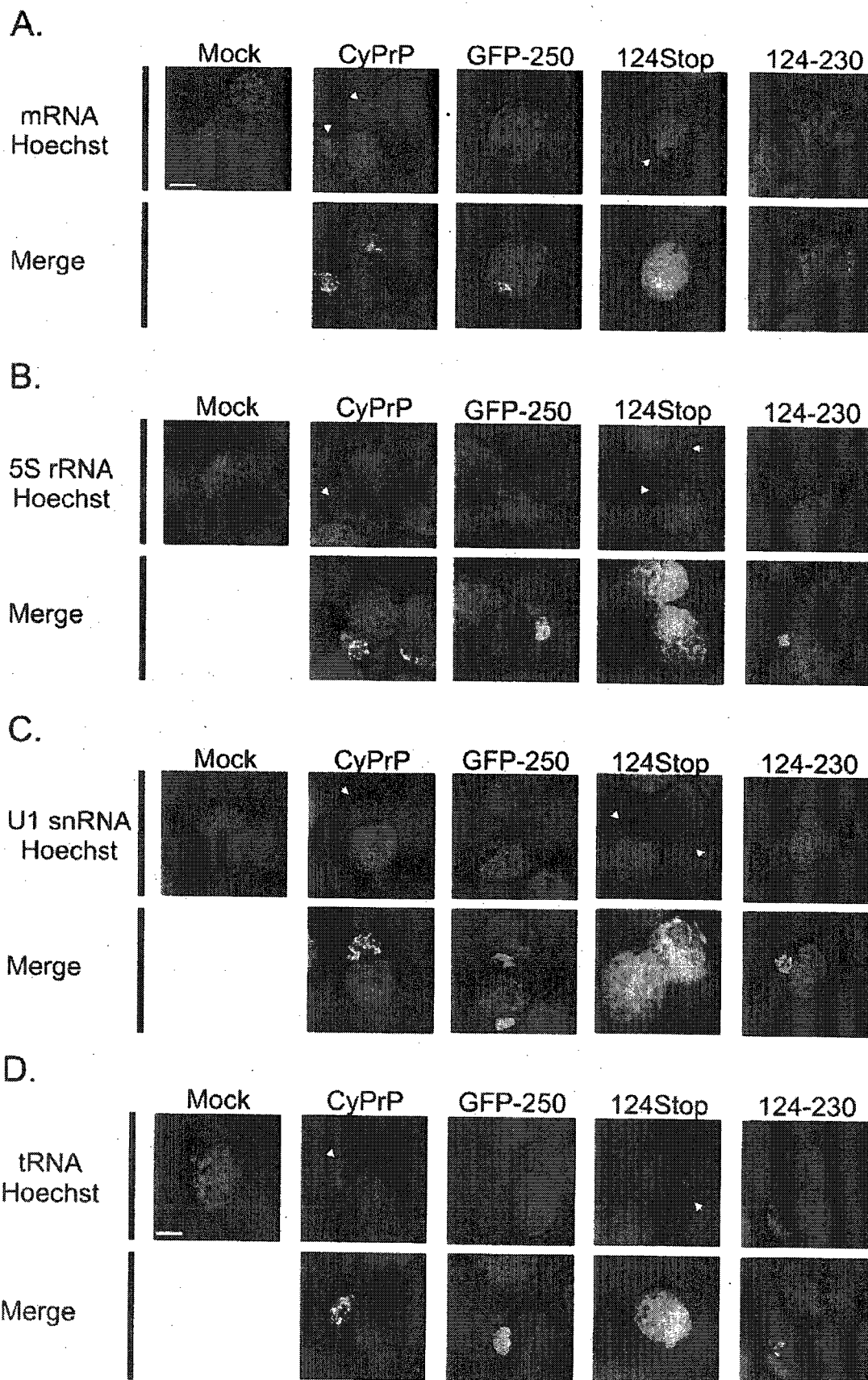
- [42]N. Kotaja, P. Sassone-Corsi, The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (2007) 85-90.
- [43]C.C. Zhang, A.D. Steele, S. Lindquist, H.F. Lodish, Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 2184-2189.
- [44]A.D. Steele, J.G. Emsley, P.H. Ozdinler, S. Lindquist, J.D. Macklis, Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 3416-21.
- [45]D. Marc, R. Mercey, F. Lantier, Scavenger, transducer, RNA chaperone? What ligands of the prion protein teach us about its function, *Cell Mol Life Sci.* 64 (2007) 815-29.
- [46]C. Gabus, E. Derrington, P. Leblanc, J. Chnaiderman, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W.K. Surewicz, D. Marc, P. Nandi, J.L. Darlix (2001) The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1, *J Biol Chem.* 276 (2001) 19301-19309.
- [47]M. Moscardini, M. Pistello, M. Bendinelli, D. Ficheux, J.T. Miller, C. Gabus, S.F. Le Grice, W.K. Surewicz, J.L. Darlix, Functional interactions of nucleocapsid protein of feline immunodeficiency virus and cellular prion protein with the viral RNA, *J Mol Biol.* 318 (2002) 149-159.
- [48]V. Adler, B. Zeiler, V. Kryukov, R. Kasczak, R. Rubenstein, A. Grossman, Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP^{Sen} to PrP^{Res} in vitro, *J. Mol. Biol.* 332 (2003) 47-57.
- [49]N.R. Deleault, R.W. Lucassen, S. Supattapone, RNA molecules stimulate prion protein conversion, *Nature* 425 (2003) 717-720.

[50]P.K. Nandi, J.C. Nicole, Nucleic acid and prion protein interaction produces spherical amyloids which can function in vivo as coats of spongiform encephalopathy agent, J. Mol. Biol. 344 (2004) 827-837.

[51]N.R. Deleault, B.T. Harris, J.R. Rees, S. Supattapone, Formation of native prions from minimal components in vitro, Proc Natl Acad Sci U S A. 104 (2007) 9741-9746.

[52]J.C. Geoghegan, P.A. Valdes, N.R. Orem, N.R. Deleault, R.A. Williamson, B.T. Harris, S. Supattapone, Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions, J Biol Chem. 282 (2007) 36341-36353.

[53]R. Zahn, A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. López García, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, K. Wüthrich, NMR solution structure of the human prion protein, NMR solution structure of the human prion protein, Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000) 145-50.



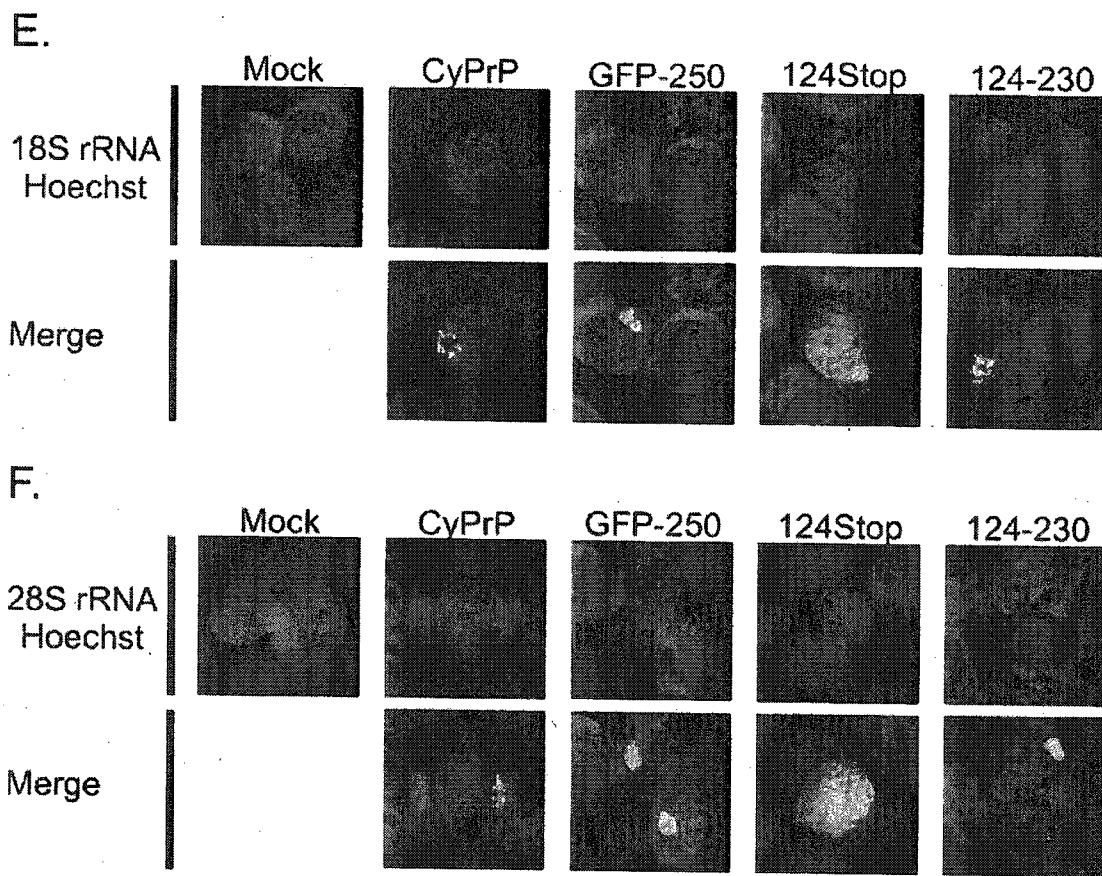


Figure 1: Localization of mRNA, 5S rRNA, U1 snRNA, tRNA, 18S and 28S rRNAs in cells expressing different protein constructs.

In situ hybridization was performed with a biotin-labelled oligo(dT) probe to detect mRNAs with a polyA tail (A), or biotin-labelled nucleotide probes specific for 5S rRNA (B), U1 snRNA (C), tRNA (D), 18S rRNA (E), or 28S rRNA (F). N2a cells were either mock-transfected, transfected with CyPrP^{EGFP}, GFP-250, CyPrP^{EGFP}124stop (124 stop), or CyPrP^{EGFP}124-230 (124-230), as indicated. RNA molecules were revealed with alexa568-labelled streptavidin (red), and nuclei were stained with Hoechst (blue). Red and blue channels are shown merged (top panels), and merged with the green channel (bottom panels). White arrows indicate the formation of RNA aggregates. Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 90.

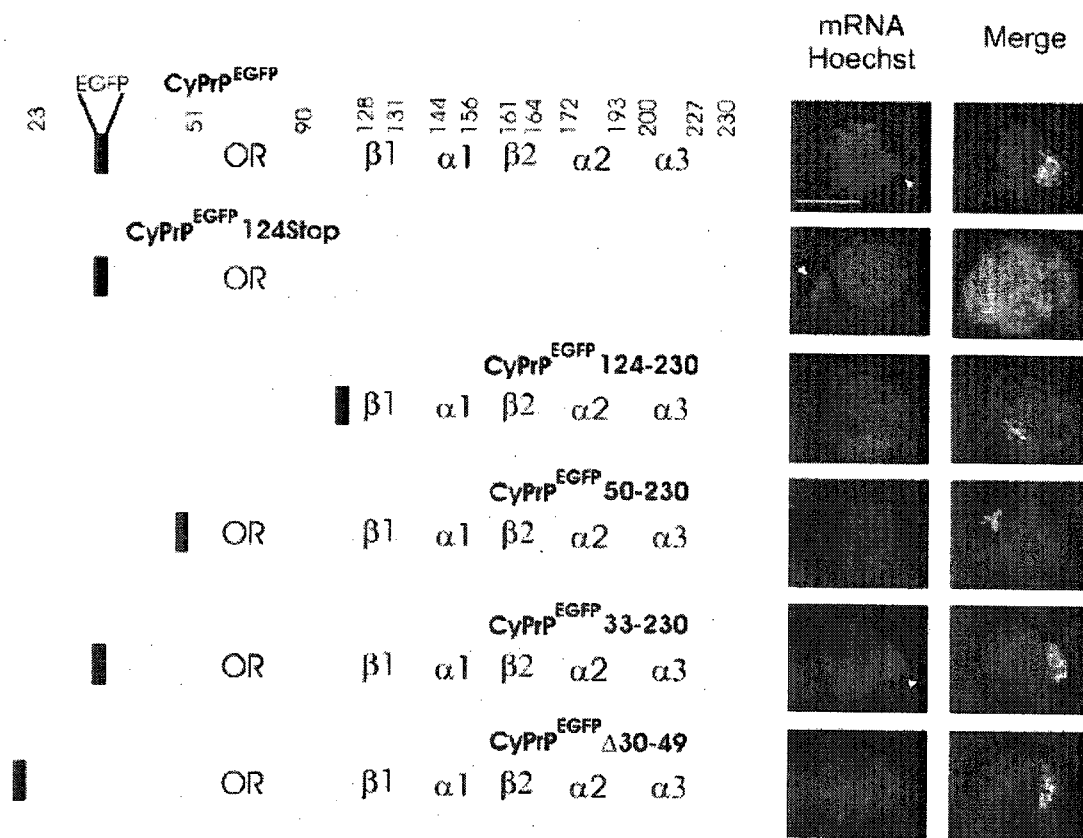
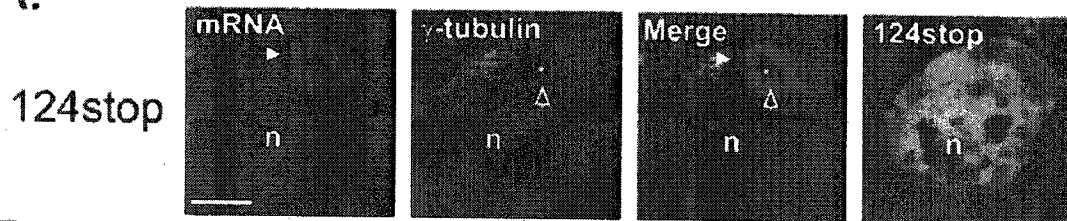


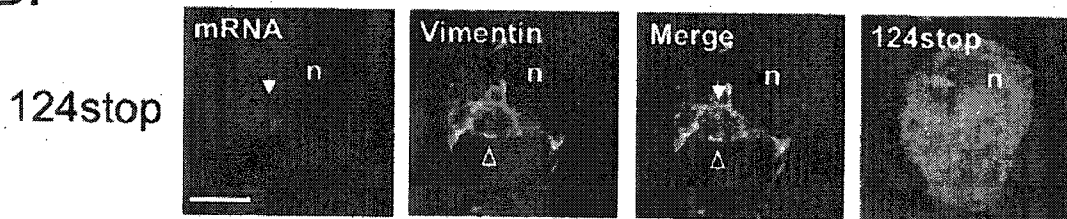
Figure 2: The domain located between residues 30 and 49 is necessary for the assembly of PrP-RNP.

Diagrams of CyPrP^{EGFP} and several deletion mutants engineered in this study are represented. Numbers indicate residues at the junction of different structural domains (adapted from [53]). Black box represents EGFP coding sequence. The formation of PrP-RNPs was evaluated by in situ hybridization with a biotin-labelled oligo(dT) probe and alexa568-labelled streptavidin to detect mRNAs (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Red and blue channels are shown merged (left panels), and merged with the green channel (right panels). White arrows indicate PrP-RNPs. Scale bar: 10 μ m. Original magnification \times 90.

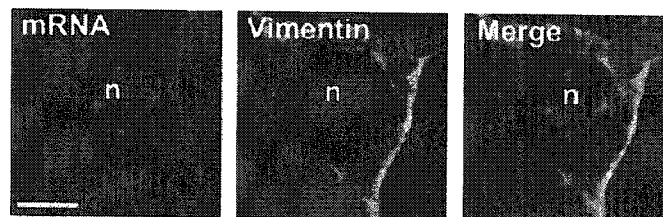
A.



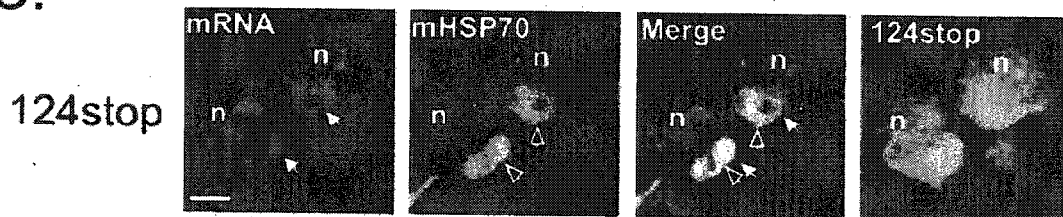
B.



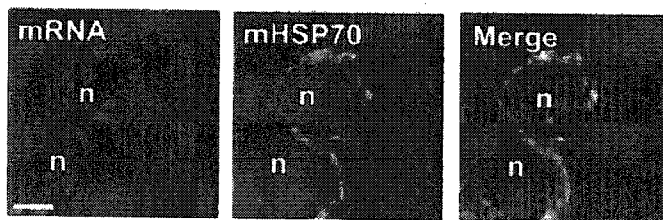
Mock



C.



Mock



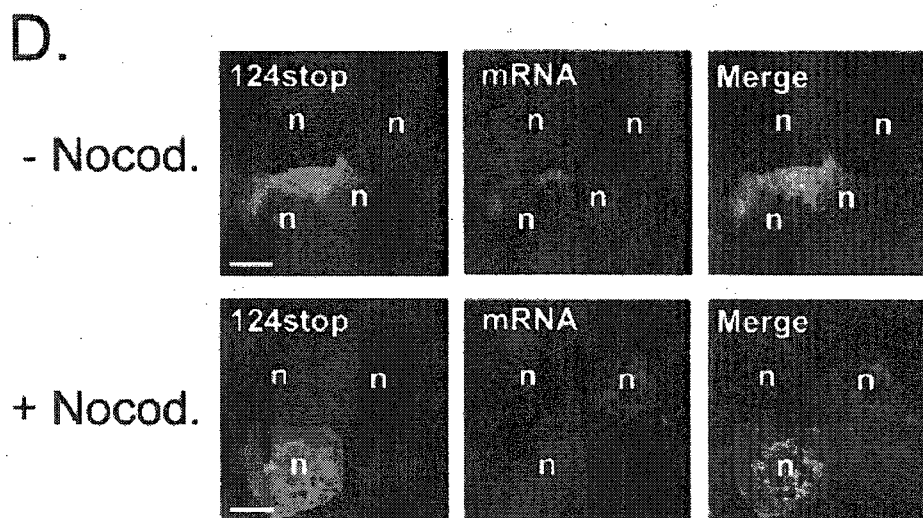
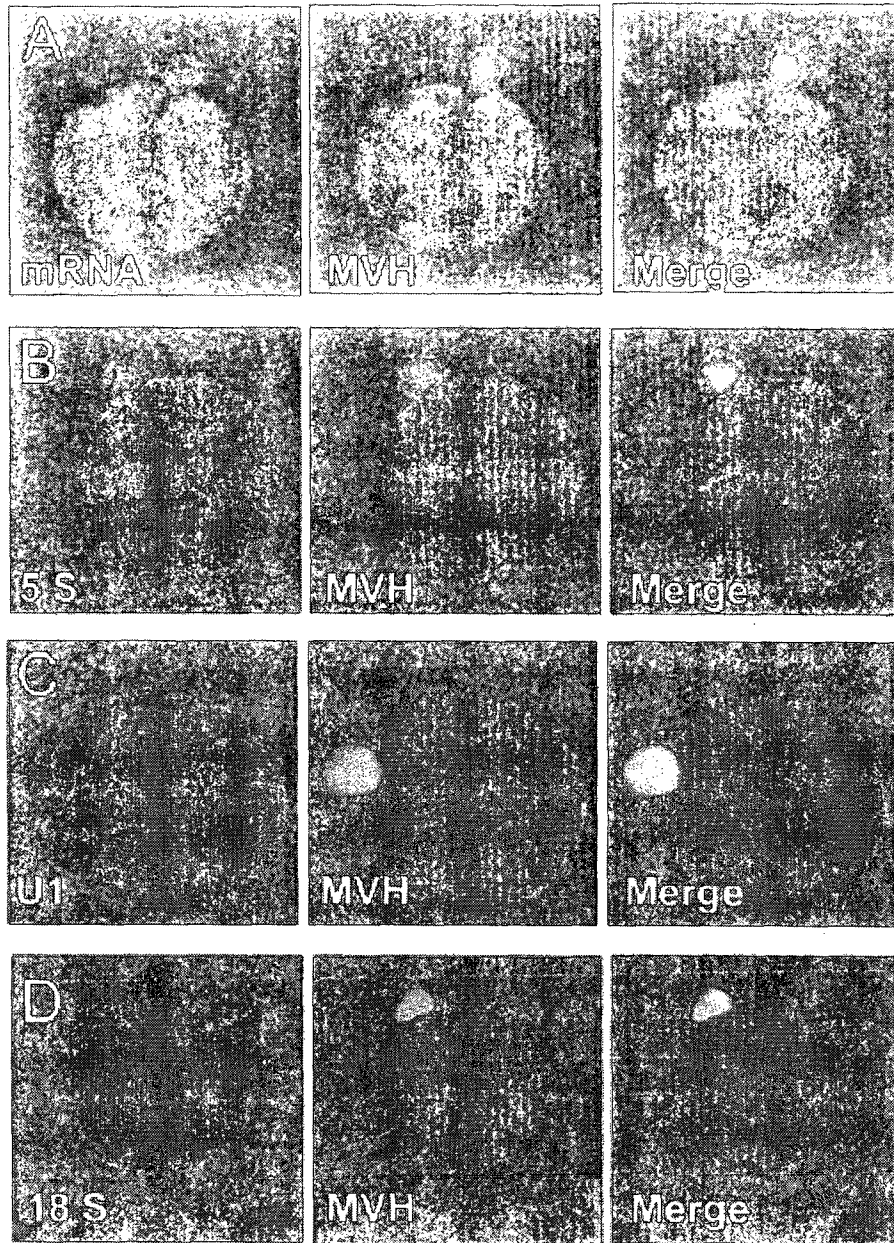


Figure 3: Aggresomal characteristics of PrP-RNPs.

Confocal analysis of γ -tubulin (A), vimentin (B), and mtHSP70 (C) (cyan channel) in mock-transfected N2a cells or in cells transfected with CyPrP^{EGFP}124stop (green channel), as indicated. PrP-RNPs (white arrows) were detected by in situ hybridization with a biotin-labelled oligo(dT) probe and alexa633-labelled streptavidin (red). Red and cyan channels are shown merged. N, nucleus. Empty arrows indicate the centrosome (A), the cage of vimentin (B), and the clustering of mitochondria (C). (D) Distribution of mRNA in cells incubated for 12 hrs in the presence of nocodazole (10 μ g/ml). Cells were transfected with CyPrP^{EGFP}124stop 12 h prior to the addition of nocodazole.

Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.



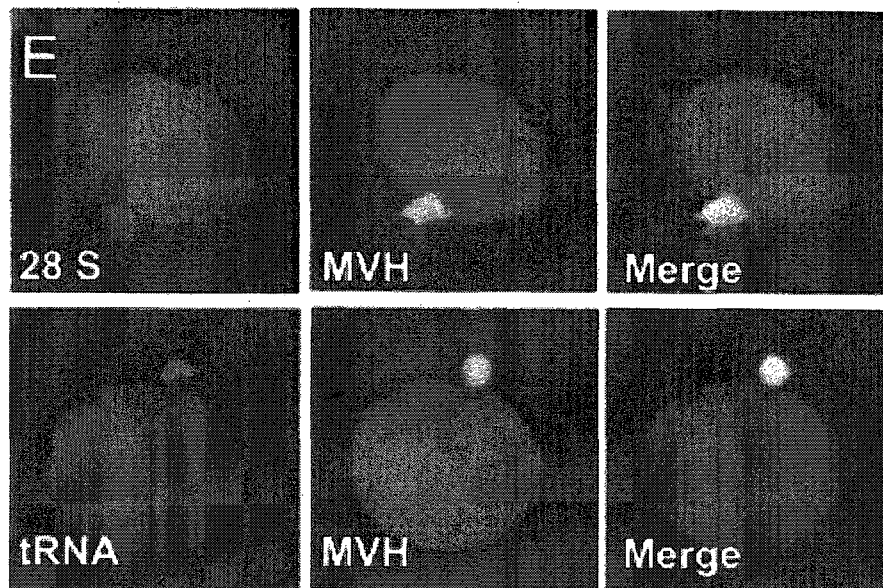


Figure 4: Localization of different RNAs in chromatoid bodies by in situ hybridization and confocal microscopy.

Squashed samples from stage V-VII mouse seminiferous tubules were used. In situ hybridization was performed with a biotin-labelled oligo(dT) probe to detect mRNAs (A), or biotin-labelled nucleotide probes specific for 5S rRNA (B), U1 snRNA (C), 18S rRNA (D), 28S rRNA (E), or tRNA (F) (red channel). RNA molecules were revealed with alexa633-labelled streptavidin (red). After in situ hybridization, VASA homolog MVH signals were detected by immunofluorescence (green channel), and nuclei were stained with Hoechst (blue channel). Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.

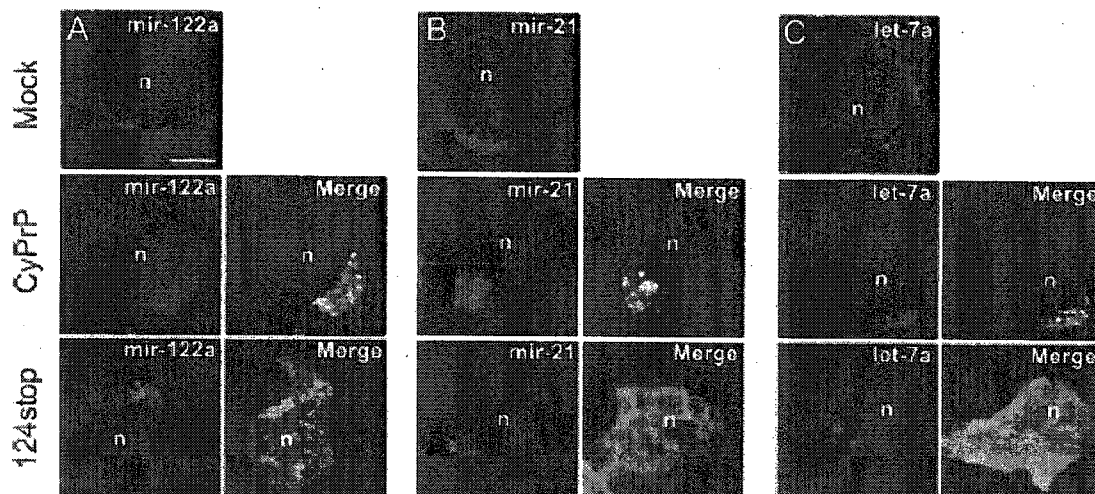


Figure 5: miRNAs are concentrated in PrP-RNPs.

Biotin-labelled nucleotide probes specific for miR-122a (A), miR-21 (B), and let-7a (C) were used to determine the distribution of miRNAs in mock-transfected N2a cells, or cells transfected with CyPrP^{EGFP} or CyPrP^{EGFP} 124stop (green channel), as indicated. The miRNAs were revealed by confocal microscopy with alexa568-labelled streptavidin (red channel). N, nucleus. Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.

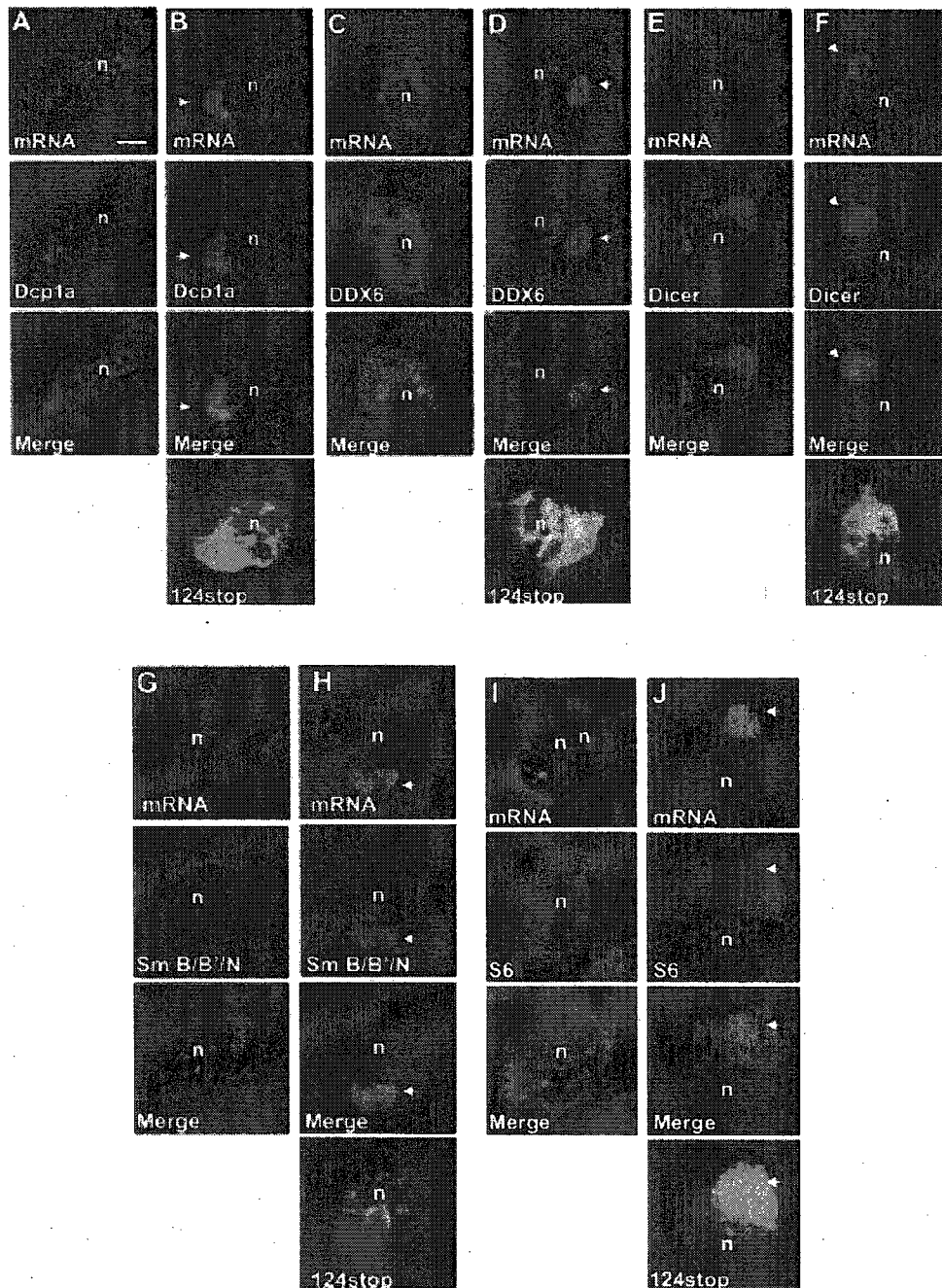


Figure 6: Localization of Dcp1a, DDX6, Dicer, and SmB/B'/N in PrP-RNPs by confocal microscopy.

PrP-RNPs (arrows) were revealed by in situ hybridization with a biotin-labelled oligo(dT) probe to detect mRNAs (red channel) in mock-transfected N2a cells (A, C, E, G, I) or N2a cells expressing CyPrP^{EGFP}124stop (green channel in B, D, F, H, J). Following in situ hybridization, Dcp1a (A, B), DDX6 (C, D), Dicer (E, F), SmB/B'/M (G, H), and ribosomal S6 protein (I, J) were detected by immunofluorescence using specific antibodies (blue channel). n, nuclei. Arrows show PrP-RNPs. Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.

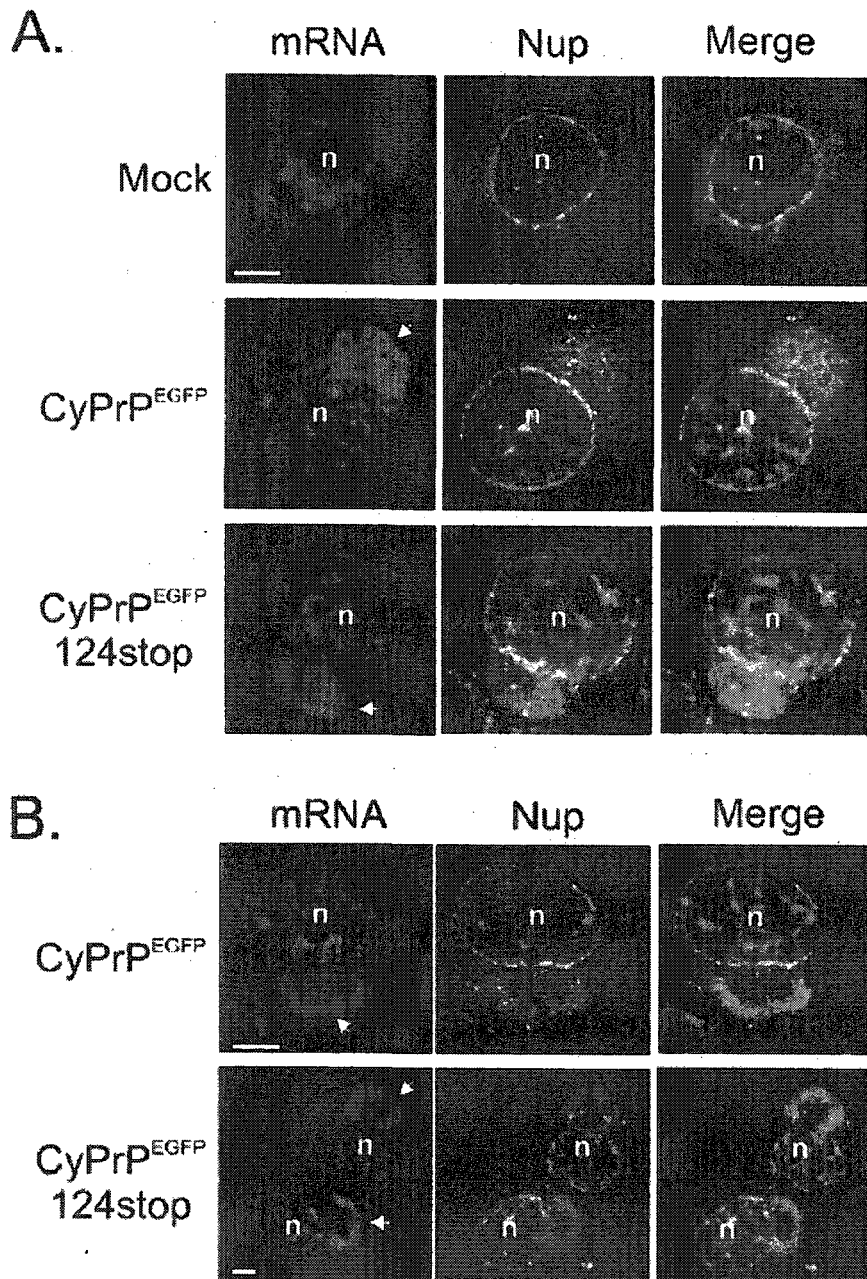


Figure 7: PrP-RNPs are proximal to the nuclear envelope and contain FXFG repeats nucleoporins.

Confocal images of PrP-RNPs revealed by in situ hybridization with a biotin-labelled oligo(dT) probe and alexa633-labelled streptavidin to detect mRNAs (red channel) in mock-transfected N2a cells, or in N2a cells expressing CyPrP^{EGFP} or CyPrP^{EGFP}124stop, as indicated. Following in situ hybridization, FXFG repeats nucleoporins (Nup) were detected by immunofluorescence using specific antibodies (yellow channel). (A) PrP-RNPs are mainly located in close contact to the nuclear envelope. (B) PrP-RNPs may also be observed far from the nuclear envelope. (A, B), some FXFG repeats nucleoporins are detected within PrP-RNPs. n, nuclei. Arrows show PrP-RNPs. Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.

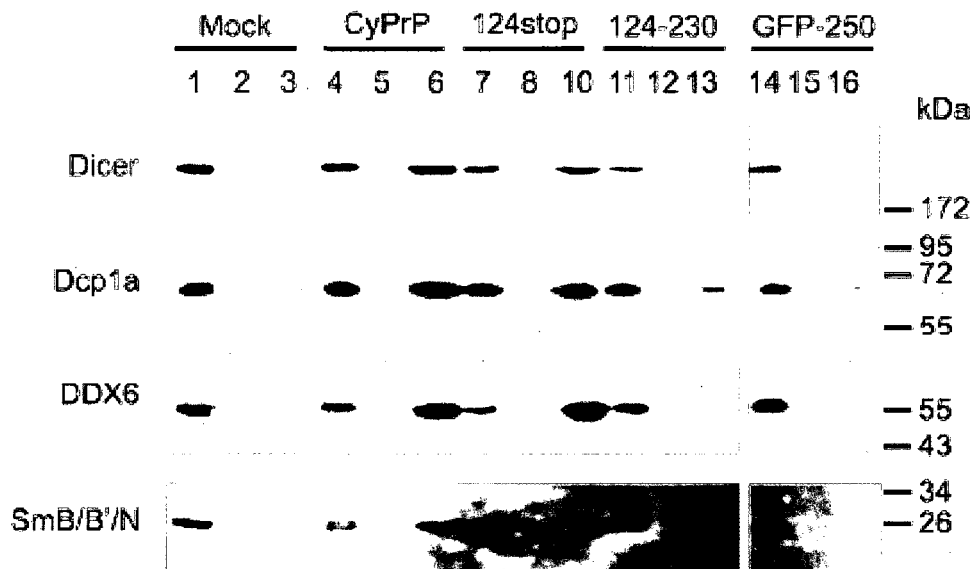


Figure 8: Association of PrP-RNPs and vimentin.

Co-immunoprecipitation experiments with anti-vimentin antibodies were performed using mock-transfected N2a cells (lanes 1-3), or N2a cells transfected with CyPrP^{EGFP} (lanes 4-6), CyPrP^{EGFP}124stop (lanes 7-10), CyPrP^{EGFP}124-230 (lanes 11-13), or GFP-250 (lanes 14-16). Lanes 1, 4, 7, 11, 14 show Dicer, Dcp1, DDX6, and SmB/B'/N in 5% of total cell lysate. Lanes 2, 5, 8, 12, and 15 show affinity-purified Dicer, Dcp1, DDX6, and SmB/B'/N using isotype control antibodies. Lanes 3, 6, 10, 13, and 16 show affinity-purified Dicer, Dcp1, DDX6, and SmB/B'/N using anti-vimentin antibodies. Molecular weight markers in kDa are indicated on the right. This experiment is representative of three independent experiments.

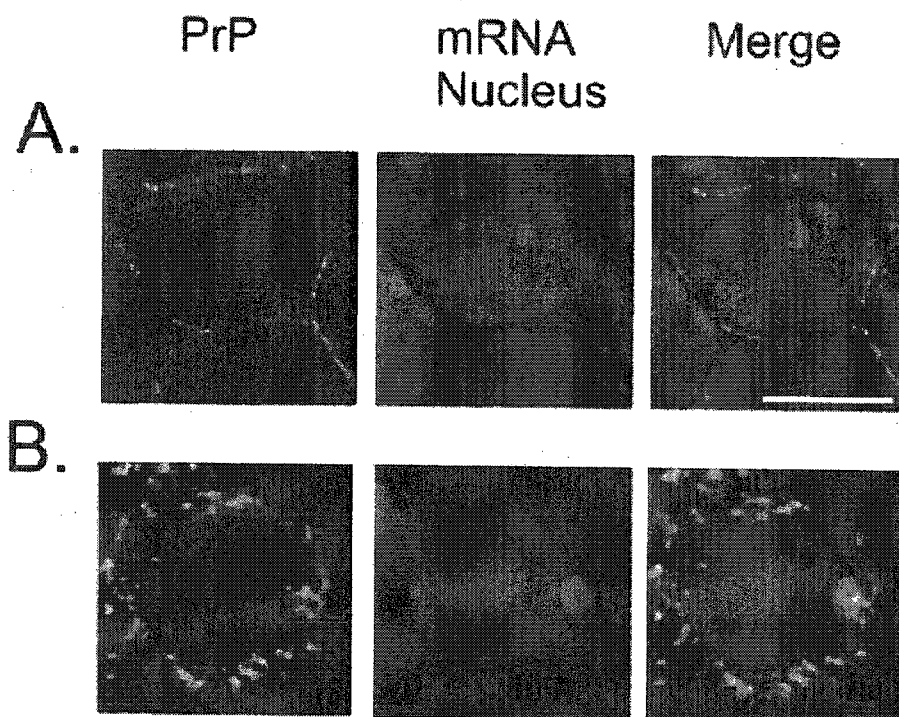


Figure 9: Cytoplasmic localization of endogenous PrP in germ cells containing a chromatoid body.

Confocal images of squashed samples from pachitene stage (before second meiosis, A) and haploid stage (B) of mouse seminiferous tubules. In situ hybridization was performed with a biotin-labelled oligo(dT) probe to detect mRNAs. mRNAs were revealed with alexa633-labelled streptavidin (red). After in situ hybridization, endogenous PrP signals were detected by immunofluorescence (SAF32 antibody, green channel), and nuclei were stained with Hoechst (blue channel). Scale bar: 5 μ m. Original magnification \times 60.

2.3. Matériel et méthodes supplémentaires

2.3.1. Cytométrie sur lame

Des cellules N2a ont été transfectées avec le réactif Exgen500 (Fermentas, Burlington, ON, Canada) dans du DMEM supplémenté de 10% sérum fœtal bovin et le milieu a été changé après 16 heures. Les cellules ont été transfectées soit avec le plasmide 124stop-eGFP-pCEP4 β ou le plasmide CyPrP-eGFP-pCEP4 β et sont incubées à 37°C pour 24 heures. Le lendemain, les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde 4% et ensuite, une hybridation *in situ* avec une sonde oligo-(dT) biotinylée a été effectuée tel que décrit précédemment dans l'article. Il est important de noter que la streptavidine utilisée doit être couplée au fluorophore Alexa Fluor 633 et non à l'Alexa Fluor 568. Le marquage du noyau avec le hoescht a été fait. Par la suite, il suffit d'envoyer les spécimens à la cytométrie sur lame afin de quantifier l'intensité de fluorescence observée pour chaque fluorophore utilisé.

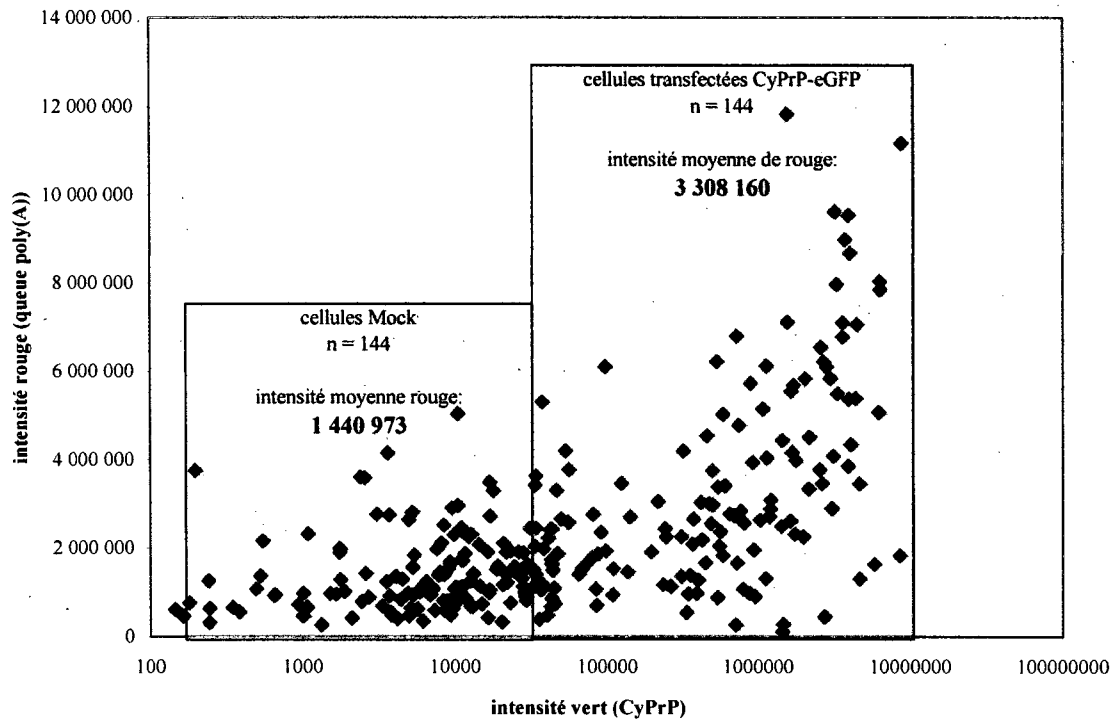
2.4. Résultats supplémentaires

2.4.1. Changement du métabolisme des ARNs poly(A)

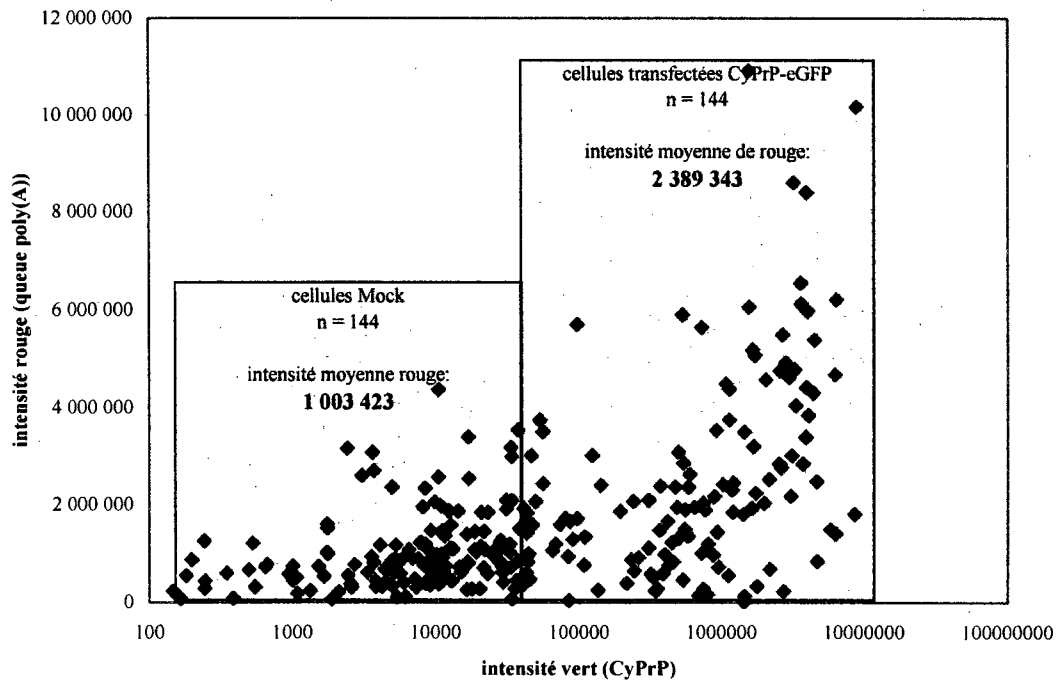
Auparavant, nous avons déterminé par FISH («fluorescence *in situ* hybridization») que les ARNs poly(A) sont localisés au niveau de la particule PrP-RNP. Lors de ces observations, nous avons aussi remarqué que l'intensité de fluorescence rouge, correspondant aux queues poly(A), est beaucoup plus élevée chez les cellules transfectées avec 124stop ou CyPrP que les cellules non transfectées. Nous avons donc voulu quantifier les différentes intensités de fluorescence afin de déterminer s'il existe une relation entre l'expression de nos protéines tronquées et la quantité de queues poly(A) au sein des cellules. À l'aide de nos graphiques, nous pouvons affirmer qu'il y a une relation entre la quantité de protéines tronquées et la quantité de queues poly(A) au sein des cellules, c'est-à-dire que plus il y a de protéines tronquées exprimées, plus la quantité de queues poly(A) augmente au sein de la cellule, tant au niveau de la cellule complète qu'au niveau du noyau et du cytoplasme des cellules. Les

intensités moyennes de fluorescence rouge chez les cellules transfectées par CyPrP-eGFP sont respectivement pour la cellule complète, le noyau et le cytoplasme de 3 308 160, 2 389 343 et 877 015. Tandis que chez les cellules Mock, les intensités moyennes de fluorescence rouge pour la cellule entière, le noyau et le cytoplasme sont respectivement de 1 440 973, 1 003 423 et 400 271. Les rapports d'intensités entre les cellules transfectées et les cellules Mock sont respectivement de 2,3 ; 2,4 et de 2,2. Nous avons observé la même tendance pour les cellules transfectées avec 124stop-eGFP. Les intensités moyennes de fluorescence rouge chez les cellules transfectées avec 124stop-eGFP sont pour la cellule entière, le noyau et le cytoplasme sont respectivement de 2 121 431, 1 508 634 et 612 797. Tandis que chez les cellules Mock, les intensités de fluorescence rouge pour la cellule entière, le noyau et le cytoplasme sont respectivement de 904 804, 706 867 et 197 937. Le rapport d'intensité de fluorescence rouge pour la cellule entière est de 2,3 ; pour le noyau, 2,1 et pour le cytoplasme, 3,1. L'expression de CyPrP et de 124stop augmente considérablement l'intensité de fluorescence rouge qui correspond aux queues poly(A).

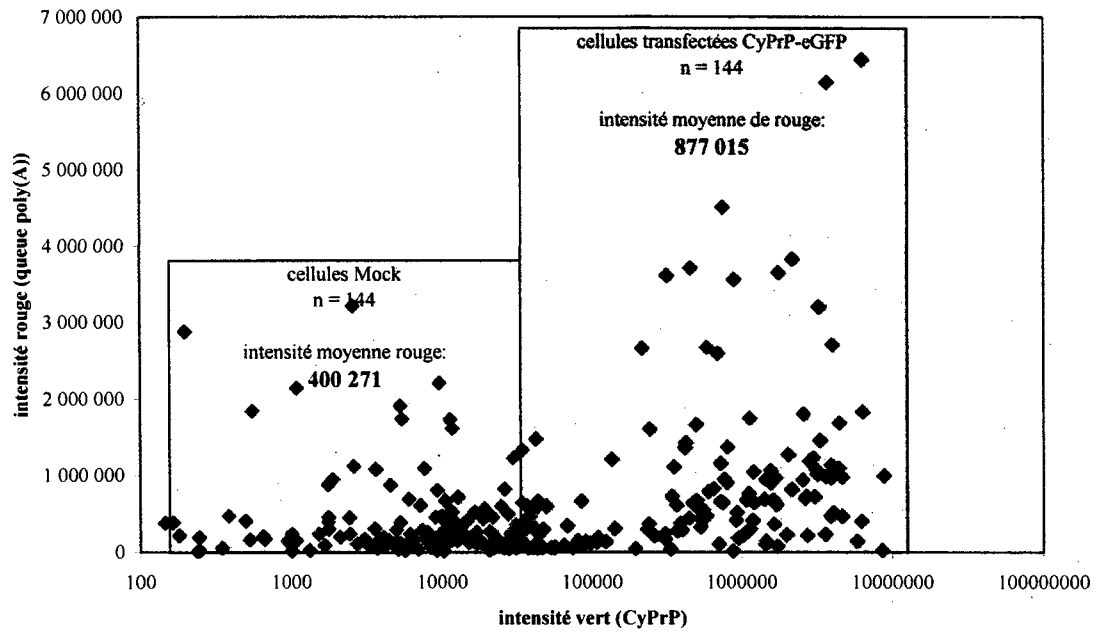
Intensité de fluorescence rouge cellulaire (queue poly(A)) selon l'intensité vert (CyPrP)



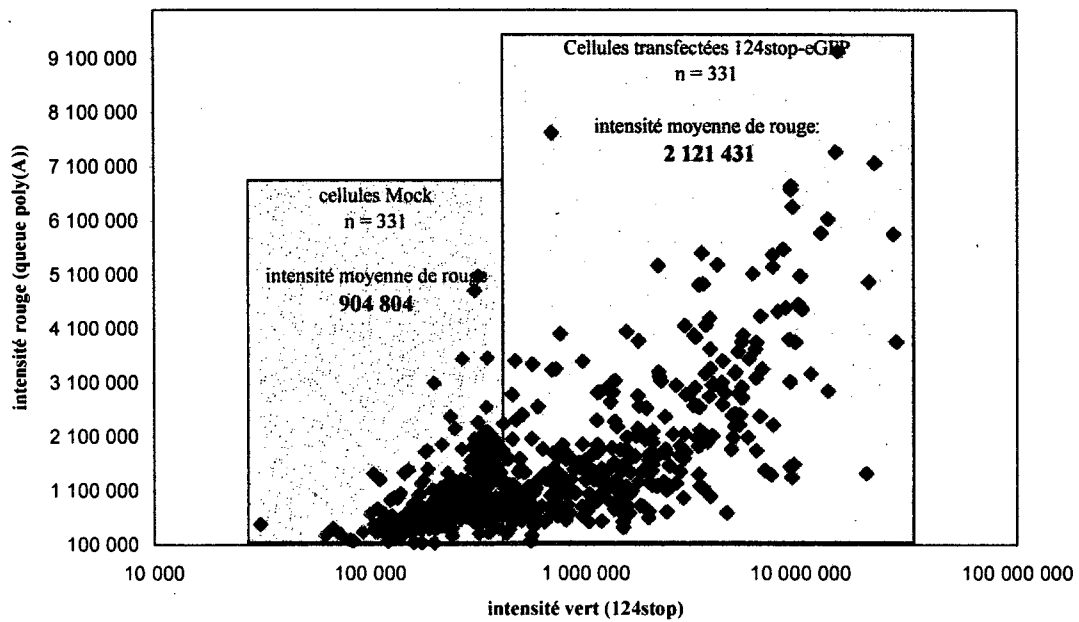
Intensité de fluorescence rouge nucléaire (queue poly(A)) selon l'intensité vert (CyPrP)



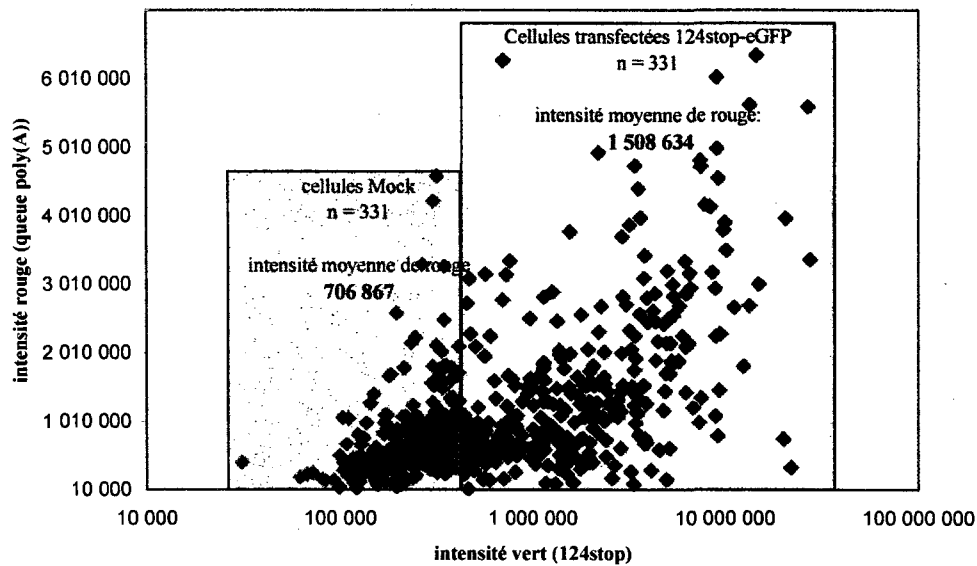
Intensité de fluorescence rouge cytoplasmique (queue poly(A)) selon l'intensité vert (CyPrP)



Intensité de fluorescence rouge cellulaire (queue poly(A)) selon l'intensité de vert (124stop)



Intensité de fluorescence rouge nucléaire (queue poly(A)) selon l'intensité de vert (124stop)



Intensité de fluorescence rouge cytoplasmique (queue poly(A)) selon l'intensité de vert (124stop)

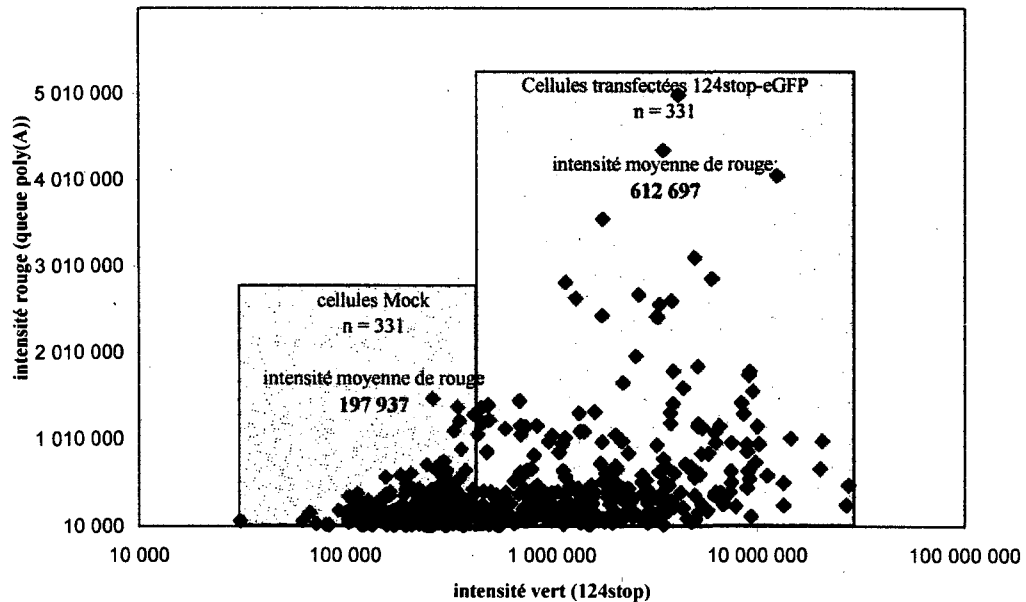


Figure supplémentaire 1 : Graphiques de l'intensité de rouge (ARN poly(A)) en fonction de l'intensité de vert (protéine PrP tronquée) chez les cellules transfectées (encadré vert) et non transfectées (encadré orange) selon le compartiment cellulaire, c'est-à-dire soit la cellule complète, le cytoplasme et le noyau.

2.4.2. L'expression de PrP^C au niveau de la spermatogonie :

Nous avons démontré précédemment que la localisation de PrP^C est très différente au sein des cellules de la deuxième étape de la spermatogénèse, le stade de pachytène (les spermatocytes), et de la troisième étape, le stade des spermatides plus spécifiquement des spermatides rondes. Nous avons voulu déterminer la localisation de PrP^C au sein des cellules de la spermatogonie, première étape de la spermatogénèse. PrP^C se retrouve localisée au niveau du cytoplasme comme au niveau des cellules rondes. Donc, la localisation de PrP^C évolue avec la spermatogénèse. En premier lieu, lors de la spermatogonie, PrP^C se retrouve dans le cytoplasme des cellules et par la suite, au niveau des spermatocytes, PrP^C se retrouve majoritairement à la membrane plasmique. Enfin, chez les spermatides rondes, PrP^C se relocalise au niveau du cytoplasme.

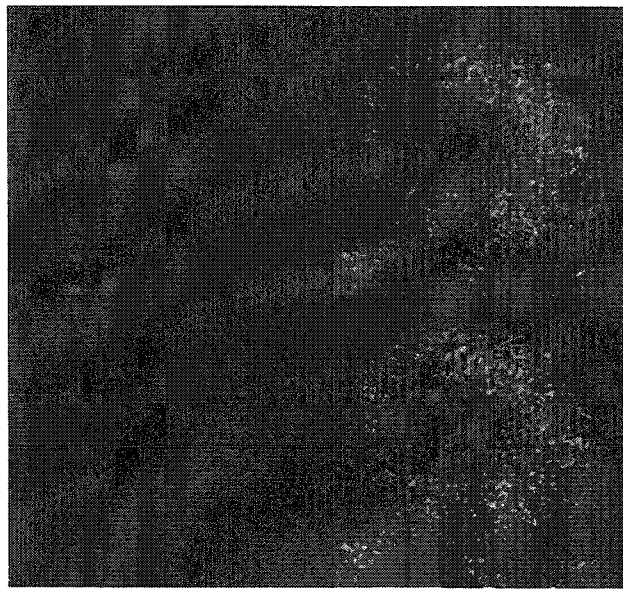


Figure 5 Localisation de PrP^C au niveau de la spermatogonie :

Images confocales de cellules de la spermatogonie du tubule séminifère de souris. Nous avons marqué les ARNs poly(A) par hybridation *in situ* (FISH) avec une sonde oligo-(dT)-biotinylé. Les ARNs poly(A) ont été révélés avec la streptavidine couplée à l'Alexa633 (rouge). Suite au FISH, nous avons détecté le PrP^C endogène par immunofluorescence (anticorps SAF32, vert), et le noyau a été coloré par du hoechst (bleu). Objectif 60X a été utilisé.

3. Discussion :

3.1. Une nouvelle particule RNP induite par PrP et sa similarité avec le corps chromatöide

Nous avons démontré la présence d'une nouvelle particule RNP induite par PrP cytoplasmique dans des cultures cellulaires. Pour des raisons de simplification, cette particule a été appelée PrP-RNP (Goggin et al. 2008). L'agrégation d'ARN au sein d'une cellule n'est pas un phénomène rare, il existe plusieurs particules RNPs dans les cellules différenciées qui sont en fait des phénomènes d'agrégation d'ARN, dont les granules de stress (GS), les P-Bodies et le corps chromatöide (CB) (Anderson and Kedersha 2006, Kedersha and Anderson 2007, Kedersha et al. 2005).

Les GS et la particule PrP-RNP : Les granules de stress sont des particules RNP constituées d'ARNm, de mi-ARN et des protéines TIA-1, TIAR, Hur et G3BP (Gallouzi et al. 2000, Gilks et al. 2004, Tourriere et al. 2003). Ils seraient un lieu de triage des ARNm où ceux-ci sont soit stabilisés et entreposés ou envoyés vers la machinerie de traduction ou vers les P-bodies pour leur dégradation ou leur répression (Anderson and Kedersha 2002a, Anderson and Kedersha 2002b, Anderson and Kedersha 2006, Kedersha and Anderson 2002, Kedersha et al. 2000, Kedersha et al. 2005, Kedersha et al. 1999, Kimball et al. 2003). Précédemment, nous avons démontré que les PrP-RNPs inhibent la formation des GS sans séquestrer les protéines importantes comme TIA, TIAR, Hur et G3BP (Goggin et al. 2008).

Les P-Bodies, le CB et la particule PrP-RNP : Les P-bodies sont constitués d'ARNm, d'ARNs non-sens (Bruno and Wilkinson 2006, Durand et al. 2007, Fukuhara et al. 2005) et de mi-ARNs (Chan and Slack 2006, Eulalio et al. 2007b, Eulalio et al. 2007c). Les P-Bodies ont un rôle dans dégradation des ARNm et des ARNs non-sens ainsi que dans la régulation de la

traduction (Durand et al. 2007, Eulalio et al. 2007b, Fukuhara et al. 2005, Liu and Gall 2007, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2006, Unterholzner and Izaurralde 2004). Les P-Bodies sont constitués de diverses protéines associées à la voie des mi-ARNs comme GW182 (Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Parker and Sheth 2007) et les protéines de la famille des argonautes (Behm-Ansmant et al. 2006, Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Jakymiw et al. 2005, Jakymiw et al. 2007, Liu et al. 2005a, Liu et al. 2005b, Parker and Sheth 2007, Sen and Blau 2005) ce qui confirme leurs implications dans la régulation de la traduction et la stabilité des ARNm. De plus, les P-Bodies sont composés de protéines essentielles à la dégradation 5'→3' des ARNm comme les 4 poly(A) nucléase soit Pan2-3, Caf1 et Ccr4 (Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth 2007, Yamashita et al. 2005, Zheng et al. 2008), la protéine Dcp1a et Dcp2, enzyme de *decapping*, (Behm-Ansmant et al. 2006, Collier and Parker 2004, Cougot et al. 2004, Eulalio et al. 2007a, Eulalio et al. 2007b, Hillebrand et al. 2007, Parker and Sheth 2007, Rehwinkel et al. 2005, Sheth and Parker 2003, van Dijk et al. 2002), l'exonucléase 5'→3' XRN1, (Collier and Parker 2004, Cougot et al. 2004, Eulalio et al. 2007b, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2003), et certaines protéines Sm qui participe aussi la déadénylation des ARNs (Cougot et al. 2004, Eulalio et al. 2007b, Ingelfinger et al. 2002, Parker and Sheth 2007). Enfin, les P-bodies sont aussi constitués de protéines responsable de la dégradation des ARNs non-sens tels que les protéines de la famille des SMG et de la famille des UPF (Durand et al. 2007, Eulalio et al. 2007b, Fukuhara et al. 2005, Parker and Sheth 2007, Sheth and Parker 2006, Unterholzner and Izaurralde 2004). Certaines études suggèrent aussi une association entre les U-bodies et les P-Bodies. Les U-Bodies sont des particules RNPs impliquées dans l'assemblage des complexes SMN contenant des petits ARN nucléaires U et les protéines Sm. Ces complexes sont nécessaire pour l'épissage alternatif des ARNm (Liu and Gall 2007).

Il existe une autre particule RNP similaire aux P-Bodies que l'on retrouve au niveau des cellules germinales et des cellules souches somatiques totipotentes de vers planaires (Parvinen 2005, Yoshida-Kashikawa et al. 2007). Cette particule se nomme corps chromatoïde (CB). Comme les P-Bodies, le CB est composé entre autres de mi-ARNs et d'ARNm mais pas d'ARNs non-sens (Biggiogera et al. 1990, Kotaja et al. 2006a, Moussa et al. 1994, Oko et al. 1996, Saunders et al. 1992, Soderstrom and Parvinen 1976). On retrouve aussi l'ARNr 5S (Figuroa and Burzio 1998) et le petit ARN nucléaire U1 (Moussa et al. 1994). La localisation des ARNr 18S et 28S demeure inchangée (Figuroa and Burzio 1998). Les études précédentes ont déterminées la localisation des différents ARNs au niveau du CB par des techniques biochimiques. Pour notre part, nous avons vérifié la localisation des ARNs par FISH, une technique plus sensible et visuelle. Contrairement aux études précédentes (Figuroa and Burzio 1998), nous avons démontré que le CB est aussi composé de l'ARNt-CAG-Leu. Au niveau protéique, le CB possède une composition similaire aux P-Bodies. Par exemple, nous y retrouvons des protéines associées à la voie des mi-ARNs, GW182 et argonautes, et à la voie de dégradation 5'→3' des ARNm, dont XRN1 et le complexe Dcp1a/Dcp2. Contrairement aux P-Bodies, le CB est aussi constitué de la protéine Dicer (Kotaja et al. 2006a) et des protéines Sm (Bilinski et al. 2004, Moussa et al. 1994) impliquées respectivement dans la biogénèse des mi-ARNs, et l'épissage alternatif et la déanylation des ARNm, mais aucune protéine associée à la voie NMD n'est retrouvée au sein du CB. De plus, comme les P-Bodies, le CB est constitué d'ARN hélicase du type DEAD-box comme DDX6 qu'on retrouve au sein des GS, des P-Bodies et du CB et plus spécifiquement pour le CB la DEAD-box RNA helicase MVH qui est exclusive aux cellules germinales. Les DEAD-box ARN hélicase sont impliquées dans les diverses voies du métabolisme des ARNs (Biggiogera et al. 1990, Figuroa and Burzio 1998, Haraguchi et al. 2005, Kotaja et al. 2006a, Kotaja et al. 2006b, Kotaja and Sassone-Corsi 2007, Moussa et al. 1994, Saunders et al.

1992). En récapitulatif, le CB, comme les P-bodies, a un rôle dans le métabolisme des ARNm au niveau de leur dégradation et de la régulation de leur traduction. Cependant, seulement le CB est impliqué au niveau de la biogénèse des mi-ARNs, de l'épissage alternatif des ARNm et au niveau du métabolisme du petit ARN U1. Les caractéristiques structurales du CB le différencient des autres particules RNPs. Par exemple, il est localisé autour du centrosome, est entouré d'une cage de vimentine, co-agrège les mitochondries et sa formation nécessite un réseau de microtubules intact (Haraguchi et al. 2005). Il est aussi bien établi que le CB est en association avec la membrane nucléaire puisqu'on retrouve des nucléoporines au sein du CB (Fawcett et al. 1970, Parvinen and Parvinen 1979, Soderstrom and Parvinen 1976). Les nucléoporines sont des protéines composant les pores nucléaires.

Pour ce qu'il est de la particule PrP-RNP, nous avons déterminé que les PrP-RNP ne sont pas seulement constituées d'ARNm et de mi-ARNs mais aussi de plusieurs autres ARNs comme le petit ARN nucléaire U1. La présence de U1 lui suggère une implication directe dans la maturation des ARNs. L'ARNt-CAG-Leu et l'ARNr 5S sont aussi localisés au sein de la particule, mais l'ARNr 18S et 28S sont absents. Au niveau structural, les PrP-RNPs sont, comme le CB, localisées autour du centrosome, entourées d'une cage de vimentine, co-agrègent les mitochondries et sa formation nécessite un réseau de microtubules intact. De plus, nous avons montré que la particule PrP-RNP est aussi associée à la membrane nucléaire puisqu'elle aussi est composée de nucléoporines. Enfin, au niveau protéique, nous avons établi que PrP-RNP est contient la protéine Dcp1a, la protéine GW182, la protéine Dicer et les protéines Sm qui sont impliquées respectivement dans la dégradation des ARNm, dans la régulation de la traduction, dans la biogénèse des mi-ARN et dans l'épissage alternatif. De plus, PrP-RNP est constituée d'ARN hélicase du type DEAD-box, dont DDX6 mais pas MVH puisqu'elle est spécifique aux cellules germinales. Donc, la composition nucléique et

protéique des PrP-RNPs et leurs caractéristiques structurales sont très similaires au CB, similaires aux P-Bodies et semblables aux GS.

Fonctions potentielles des particules PrP-RNP : Nous supposons que les PrP-RNPs auraient les mêmes fonctions que le CB, c'est-à-dire qu'elles seraient impliquées dans la régulation du métabolisme des ARNm, des mi-ARN, des ARNt, de l'ARNr 5S et du petit ARN nucléaire U1. De plus, il est connu que le CB aurait un rôle au niveau des cellules souches totipotentes, soit le maintien du phénotype de cellules souches ou la cytodifférentiation (Parvinen 2005, Sato et al. 2001, Shibata et al. 1999). La formation du CB semble également essentielle au bon développement de la spermatogénèse et plus particulièrement, au niveau des phases tardives (Biggiogera et al. 1990, Moussa et al. 1994, Oko et al. 1996, Saunders et al. 1992, Soderstrom and Parvinen 1976). Ceci nous permet de croire que la formation d'une telle structure au niveau des cellules différenciées comme les cellules N2a, leur attribut des caractéristiques de cellules souches, qui leur permettrait peut-être d'acquérir le phénotype de cellules souches. Cependant, la présence prolongée ou permanente de PrP-RNP serait sans aucun doute toxique. Si la formation de PrP-RNP est contrôlée dans le temps, alors on peut supposer que cette particule ait un rôle physiologique.

3.2. Implication de PrP dans l'agrégation des ARNs et rôles physiologiques possibles de la particule PrP-RNP :

PrP et la particule PrP-RNP : Nous avons déterminé à l'aide de deux différents mutants de CyPrP, le (124stop)CyPrP-eGFP, correspondant au domaine N-terminal non-structuré de PrP^C et le (157-230)CyPrP-eGFP, étant le domaine C-terminal responsable de l'agrégation de PrP^C, que les deux phénomènes d'agrégation, c'est-à-dire l'agrégation de PrP et celle de l'ARN, sont indépendants. De plus, nous avons approfondi la caractérisation de la région responsable de l'agrégation des ARNs et nous avons démontré que les résidus 30-49 sont impliqués dans

ce processus. L'indépendance des deux phénomènes d'agrégation nous suggère que la formation de la particule PrP-RNP serait possible en condition physiologique puisqu'il est connu qu'une faible portion de PrP^C se retrouve au niveau du cytoplasme des cellules et plus particulièrement dans une sous-population de neurone (Mironov et al. 2003). Il est aussi établi que PrP^C peut se retrouver dans le cytoplasme des cellules β -pancréatiques et s'accumuler au cours du vieillissement (Strom et al. 2007). Il serait donc possible que PrP^C cytoplasmique et la formation de la particule PrP-RNP ait un rôle physiologique important.

PrP et la spermatogénèse : Nous avons vérifié la localisation de PrP^C au niveau des cellules de la spermatogénèse et nous avons découvert que la localisation de PrP^C varie selon le stade de la spermatogénèse. Chez la spermatogonie, premier stade de la spermatogénèse, PrP^C se retrouve dans le cytoplasme des cellules. Par la suite, PrP^C se localise majoritairement à la membrane plasmique des spermatocytes lors du stade pachytène. Chez les spermatides rondes où on retrouve définitivement le CB, PrP^C se relocalise au niveau du cytoplasme des cellules mais ne colocalise pas avec le CB. Ceci nous suggère que la localisation de PrP^C est très dynamique lors de la spermatogénèse et pourrait être importante pour le bon déroulement de ce processus de différenciation cellulaire. En plus, la présence de PrP^C au cytoplasme aurait peut-être un rôle dans la formation et l'intégrité du CB et pour la différenciation des différents types de cellules de la spermatogénèse, plus particulièrement des spermatocytes et des spermatides rondes. Cependant, chez les souris KO PrP^C, aucun problème de reproduction n'a été observé. Il se peut qu'il existe différentes voies pour induire la formation du CB et assurer le bon déroulement de la spermatogénèse. Il ne serait pas surprenant que l'organisme ait développé plusieurs de voies de signalisation menant à la formation d'une telle structure RNP. D'autres particules RNP sont induites par plus d'une voie de signalisation, par exemple, la formation des GS dépend de plusieurs voies de

signalisation qui sont soit dépendantes ou indépendantes de la phosphorylation du facteur d'initiation à la traduction, eIF2 α (Anderson and Kedersha 2002a, Dang et al. 2006, Kedersha et al. 1999, Mazroui et al. 2006, Tourriere et al. 2003). Donc, nous pouvons suggérer que PrP^C, autant membranaire que cytoplasmique, aurait un rôle dans la spermatogénèse mais ne serait pas nécessaire à son bon déroulement.

PrP et les cellules souches totipotentes : De plus, PrP^C pourrait être importante pour les cellules souches somatiques et les cellules souches pluripotentes puisque nous retrouvons aussi le CB au niveau de ces cellules souches (Shibata et al. 1999, Yoshida-Kashikawa et al. 2007). Récemment, certaines études ont proposé que PrP^C aurait un rôle dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et neuronales (Sakudo et al. 2006, Steele et al. 2006, Weissmann and Flechsig 2003, Zhang et al. 2006). PrP^C pourrait être impliquée dans la détermination, le maintien du phénotype, la régénération des cellules souches ou encore dans la cytodifférenciation puisqu'il est connu que la présence du CB au sein de ces cellules aurait un rôle dans ces différents processus.

PrP, stress cellulaire et P-Bodies : Il est connu que certains stress cellulaires augmentent la quantité de PrP^C cytoplasmique (Hetz et al. 2007, Lindholm et al. 2006, Orsi et al. 2006, Rane et al. 2008, Rane et al. 2004). Il est aussi bien établi que les P-Bodies au sein des cellules augmentent considérablement en termes de quantité et de grosseur lors de stress cellulaire (Bruno and Wilkinson 2006, Jud et al. 2008). Nous avons récemment démontré que PrP cytoplasmique induit un stress cellulaire et une réponse au stress inadéquate (Goggin et al. 2008). Cette réponse inadéquate pourrait se traduire en un stress cellulaire prolongé favorisant davantage l'accumulation de PrP dans le cytoplasme des cellules. Cette accumulation de PrP cytoplasmique peut ainsi induire la formation de la particule PrP-RNP

ayant peut-être un rôle similaire aux P-Bodies. Il est même possible que la particule PrP-RNP soit en fait un gros P-Body au sein de la cellule puisqu'il est connu que les P-Bodies grossissent lors de stress cellulaire et que les deux particules RNP sont très semblables en terme de composition (Jud et al. 2008, Kotaja and Sassone-Corsi 2007). De plus, il est bien établi que PrP^C peut subir 2 types de clivage, soit le clivage β induit par les espèces ROS (reactive oxygen species) (Mange et al. 2004a, McMahon et al. 2001, Pushie and Vogel 2008, Watt and Hooper 2005, Watt et al. 2005) et le clivage α impliquant les métalloprotéinases du type ADAM (Alfa Cisse et al. 2007, Hooper 2005, Mange et al. 2004a, Vincent 2004, Vincent et al. 2008). Ces deux types de clivage mènent à la formation de différents fragments. Le clivage β induit la formation du peptide N2 extracellulaire qui correspond aux résidus 23-90 et un peptide C2 qui demeure ancré à la membrane via son ancre GPI. Le clivage α survient au niveau de la séquence possiblement neurotoxique, soit les résidues 106-126, afin de former le peptide N1 et le peptide membranaire C1. Le clivage α est le clivage dit « normal », tandis que le clivage β est le clivage de stress puisqu'il est induit en condition de stress cellulaire comme le stress oxydatif. Il est bien établi que le domaine N-terminal de la protéine a la capacité de subir l'endocytose et la macropinocytose et ainsi se retrouver au sein du cytoplasme (Lundberg et al. 2002, Magzoub et al. 2006, Nunziante et al. 2003, Oglecka et al. 2008, Sunyach et al. 2003). Il est donc possible que le peptide N2 du clivage β et le peptide N1 du clivage α subissent l'endocytose ou la macropinocytose et se retrouvent ainsi au niveau du cytoplasme des cellules. Au sein des deux peptides, nous retrouvons le domaine N-terminal responsable de la formation de la particule PrP-RNP. Ceci supporte l'hypothèse que le domaine N-terminal de PrP^C, lors de stress cellulaire, s'accumule au niveau du cytoplasme et pourrait induire la formation de la particule PrP-RNP. Ainsi, PrP cytoplasmique et la particule PrP-RNP auraient un rôle physiologique en condition de stress ou non.

PrP et le métabolisme des ARNs : La présence de mi-ARNs au sein de la particule PrP-RNP, nous permet de croire que PrP induit une voie de signalisation impliquant les micro-ARNs. Il est bien établi que PrP^C et les micro-ARNs sont impliqués au niveau de la différenciation cellulaire, la survie neuronale, l'excitabilité neuronale, la plasticité neuronale et au niveau de l'apprentissage et la mémoire (Ashraf and Kunes 2006, Ashraf et al. 2006, Aumiller and Forstemann 2008, Barenco et al. 2008, Darnell 2003, Ding et al. 2008, Fiore et al. 2008, Graner et al. 2000, Hillebrand et al. 2007, Hu et al. 2008, Lee et al. 2008, Mallucci et al. 2002, Nishida et al. 1997, Papassotiropoulos et al. 2005, Parsons et al. 2008, Prestori et al. 2008, Roesler et al. 1999, Satoh et al. 2008, Schickel et al. 2008, Steele et al. 2006, Tay et al. 2008, White-Grindley and Si 2006, Zhang et al. 2006). Il est donc possible qu'il existe une relation entre PrP^C cytoplasmique et la voie des micro-ARNs permettant ainsi d'influencer ces différents processus cellulaires. Nous avons aussi démontré qu'au sein des cellules exprimant PrP cytoplasmique, la quantité et/ou la longueur des queues poly(A) augmente considérablement. Ceci suggère que PrP influence le métabolisme des ARNs poly(A) soit en les stabilisant et les stockant ou encore en augmentant la longueur des queues poly(A) des ARNs, ce qui influence leur stabilité et la quantité de sonde pouvant s'hybrider à la même queue poly(A). De plus, l'accumulation d'ARNs poly(A) dans le noyau suggère que PrP cytoplasmique peut influencer le transport import/export nucléaire des ARNs poly(A). Il est bien connu que le transport adéquat des ARNm est très important pour la neuroexcitabilité, la plasticité neuronale et la mémoire (Bramham and Wells 2007, Hu et al. 2003, Lebeau et al. 2008, Sanchez-Carbente Mdel and Desgroseillers 2008, Steward and Worley 2002), tout comme PrP^C qui semble être aussi impliqué dans ces divers processus cellulaires. Nous suggérons ainsi que PrP^C cytoplasmique pourrait influencer la stabilité et la localisation des différents types d'ARNs poly(A) pour ainsi influencer divers processus cellulaires. La

formation d'une telle particule doit être très bien contrôlée dans le temps, sinon une présence prolongée ou permanente de PrP-RNP serait sans aucun doute toxique pour les cellules.

3.3. Rôles pathologiques possibles de la particule PrP-RNP :

Il est bien établi que l'expression de PrP cytoplasmique est toxique pour les cellules (Crozet et al. 2008, Kristiansen et al. 2005, Ma and Lindquist 2001, Ma et al. 2002, Park and Li 2008, Weissmann and Flechsig 2003). Cependant le mécanisme de cytotoxicité demeure inconnu. Récemment, nous avons démontré que l'expression de CyPrP induit une réponse au stress inadéquate et la formation de la particule PrP-RNP (Goggin et al. 2008). Nous avons aussi montré que les cellules exprimant CyPrP sont beaucoup plus susceptibles aux différents stress cellulaires. Par ailleurs, la formation d'une telle particule au sein du cytoplasme des cellules pourrait amener une dérégulation du métabolisme des divers ARNs et ainsi expliquer la cytotoxicité de CyPrP.

Les maladies neurodégénératives et le métabolisme des ARNs : Plusieurs maladies neurodégénératives impliquent des ARNs non codants. Par exemple, il a été démontré que chez la drosophile, des ARNs non codants jouerait un rôle dans le bon repliement des protéines et dans la réponse au stress (Savvateeva-Popova et al. 2007). De plus, des petits ARNs non codants structurés permettent la conversion de PrP^{sen} en PrP^{res}, une des caractéristiques des ESTs (Adler et al. 2003). Ainsi, une dérégulation du métabolisme des ARNs non codants pourrait causés le mauvais repliement et l'agrégation des protéines et ainsi induire une réponse au stress inadéquate. De plus, certains micro-ARNs seraient impliqués dans la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et des maladies reliées à un domaine polyglutamine comme la maladie d'Huntington et l'ataxie spinocérébrale de type 3 (SCA3) (Bilen et al. 2006, Cogswell et al. 2008, Hebert and De Strooper 2007, Hebert et al. 2008,

Johnson et al. 2008, Karres et al. 2007, Nelson et al. 2008, St George-Hyslop and Haass 2008, Wang et al. 2008a, Wang et al. 2008b). Il est bien établi qu'un dysfonctionnement au niveau de l'épissage alternatif peut être aussi la cause de maladies neurodégénératives. Par exemple, la maladie de l'atrophie musculaire spinale (SMA) est causée par un défaut au niveau de la protéine SMN (survival motor neuron), composant les particules U snRNP (U-bodies) impliquées directement dans l'épissage alternatif des ARNm (Eggert et al. 2006, Jones et al. 2001, Liu et al. 1997, Pellizzoni et al. 1998). D'autres maladies sont causées par un mauvais épissage alternatif d'un ARNm particulier, comme, la maladie de la sclérose amyotrophique latérale (Amyotrophic Lateral Sclerosis) qui est causée par un mauvais épissage alternatif d'ARNm dont celui codant pour la périphérine, protéine de filaments neuronaux intermédiaires, et l'ARNm codant pour le récepteur glutamate (Bai and Lipton 1998, Meyer et al. 1999, Munch et al. 2002, Robertson et al. 2003) ou encore les tauopathies qui sont causées par un mauvais épissage de la protéine tau (Glatz et al. 2006, Kar et al. 2006, Liu and Gong 2008, Meyer et al. 1999). D'autres maladies sont connues pour un épissage aberrant d'un ARNm (Orengo and Cooper 2007). Certaines maladies neurodégénératives impliquent des protéines du transport des ARNs, par exemple, la maladie du retard mental X fragile qui implique la protéine FMRP responsable du transport des ARNm au niveau des axones et des dendrites des neurones (Orengo and Cooper 2007).

PrP et le métabolisme des ARNs : Comme mentionné précédemment, l'expression de PrP cytoplasmique induit la formation de la particule PrP-RNP qui semble être impliquée dans le métabolisme des ARNs. Il serait possible que la présence de PrP^C au niveau du cytoplasme induit une dérégulation du métabolisme des ARNs. Cette dérégulation du métabolisme des ARNs pourrait mener à une neurodégénérescence et même à certaines ESTs. De plus, au cours du vieillissement, il est connu que plusieurs processus cellulaires importants sont de

plus en plus inefficaces, par exemple, le système ERAD/protéasome responsable de la dégradation de protéines dénaturées (Crozet et al. 2008, Ma and Lindquist 2001, Ma et al. 2002, Yedidia et al. 2001). Il est aussi bien établi que les mi-ARNs joueraient un rôle dans le vieillissement (Maes et al. 2008, Nelson et al. 2008, Wang 2007, Williams et al. 2007). Il est bien établi que certaines mutations dans *PRNP* augmentent la présence de PrP au niveau du cytoplasme. De plus, certaines mutations induisent une forme transmembranaire de PrP^C dont le domaine N-terminal est cytoplasmique (Hachiya et al. 2005, Helmus et al. 2008, Heske et al. 2004, Rambold et al. 2006, Stewart and Harris 2003, Zanusso et al. 1999). On peut penser que ces différentes ESTs pourraient être causées par un dysfonctionnement du métabolisme des ARNs qui pourrait être la cause de la cytotoxicité de PrP cytoplasmique. De plus, l'implication de la particule PrP-RNP lors de stress cellulaire est aussi possible, nous pouvons proposer qu'un stress cellulaire prolongé mène à l'accumulation de PrP^C cytoplasmique et à l'accroissement du clivage β de PrP^C, augmentant ainsi la quantité de PrP cytoplasmique. À une certaine concentration de PrP cytoplasmique, il est possible que ce dernier induise la formation de cette particule ou encore influence grandement le métabolisme des ARNs poly(A) et ainsi mène à l'apoptose. De plus, la présence prolongée ou permanente de PrP-RNP serait sans aucun doute toxique. Plusieurs études démontrent que certaines maladies sont dues à un mauvais fonctionnement de protéines chaperonnes à ARN responsable du bon repliement des ARNs (Savvateeva-Popova et al. 2007). Il est donc possible que les ESTs impliquent une dérégulation du métabolisme des différents types d'ARNs menant à la mort cellulaire.

Phénomène d'agrégation in vitro artefact : Il est bien important de prendre en considération que le phénomène d'agrégation des ARNs et le changement au niveau du métabolisme des ARNs pourrait être un artefact de culture cellulaire. Par exemple, la présence d'agrésome de

PrP au sein de tissus infectés n'a jamais été démontré directement mais plutôt de manière indirecte, soit en immunoprécipitant la vimentine. Il se peut aussi que la quantité de PrP cytoplasmique nécessaire à ces phénomènes soit beaucoup plus élevée que la quantité maximale possible *in vivo* ou encore qu'il existe une voie de signalisation *in vivo* qui contrebalance l'effet de PrP cytoplasmique et inhibe ainsi le phénomène d'agrégation nucléaire. De plus, afin de faciliter la visualisation de PrP, nous avons étiqueté PrP avec la protéine GFP (green fluorescence protein). Il est connu que la fabrication d'une protéine de fusion peut changer ou inhiber la fonction de la protéine réelle. Donc, il serait peut être possible que la particule PrP-RNP et l'influence de PrP sur le métabolisme des ARNs soient des phénomènes artéfactuels *in vitro*. Cependant, il demeure intéressant d'avoir une nouvelle plateforme afin d'étudier la formation du CB.

3.4. Conclusion et perspectives

Nous avons montré *in vitro* que la surexpression de CyPrP au niveau des cellules neuronales déterminées, induit l'agrégation des ARNs et la formation d'une particule RNP nommée PrP-RNP. Nous avons montré que les deux phénomènes d'agrégation, soit l'agrégation protéique et nucléaire, sont indépendants. Le domaine responsable de l'agrégation des ARNs est le N-terminal et plus particulièrement les résidus 30-49. De plus, nous avons déterminé que le domaine N-terminal de CyPrP est responsable de l'agrégation des ARNs, plus particulièrement les résidus 30-49. Nous avons aussi prouvé que la particule PrP-RNP possède une composition protéique et nucléaire très similaire au CB, c'est-à-dire qu'elles sont composées des protéines Dicer, Dcp1a, Sm, d'ARN hélicase du type DEAD-box. De plus, la particule PrP-RNP, comme le CB, est associée à la membrane nucléaire et est composée de nucléoporines. Au niveau nucléaire, nous avons démontré que PrP-RNP est constituée des mêmes ARNs que le CB, c'est-à-dire les ARNm, les mi-ARN, l'ARNr 5S et le petit ARN

nuléaire U1. Au niveau structurale, la particule PrP-RNP se localise autour du centrosome, est entourée d'une cage de vimentine, co-agrège les mitochondries et sa formation dépende d'un réseau de microtubule intact, tout comme le CB. De plus, la surexpression de CyPrP et du domaine N-terminal augmente considérablement la quantité d'ARNs poly(A) ou encore la longueur des queues poly(A). Donc, il est clair que la surexpression de nos protéines influence le métabolisme des ARNs poly(A). Nous avons aussi montré que la localisation de PrP^C au niveau de la spermatogénèse est dynamique. Au niveau de la spermatogonie, première étape de la spermatogénèse, PrP^C se retrouve localisé au niveau du cytoplasme. Par la suite, au niveau des spermatocytes, PrP^C se trouve majoritairement à la membrane plasmique et ensuite, au niveau des spermatides rondes, PrP^C se relocalise au niveau du cytoplasme. Il est connu que la formation du CB se retrouve au niveau des spermatides rondes. Nos résultats démontrent que le PrP cytoplasmique aurait peut-être un rôle physiologique en induisant une particule RNP très similaire au CB qui est impliquée au niveau de la spermatogénèse, des cellules souches somatiques et des cellules souches pluripotentes. De plus, notre système serait une excellente plateforme afin d'étudier la formation du CB. Cependant, il est aussi possible que la formation de cette particule soit à long terme neurotoxique puisqu'elle déstabilise le métabolisme des ARNs. Plusieurs maladies neurodégénératives qui impliquent une dérégulation du métabolisme des ARNs sont connues. Il serait intéressant de déterminer l'effet de cette particule sur les ARNs, c'est-à-dire si elle augmente la stabilité des ARNs, induit leur dégradation ou encore induit la formation de structures secondaires importantes pour leur régulation. Le traitement des cellules avec un inhibiteur de la transcription comme l'actinomycine nous permettrait de vérifier la stabilité des ARNs dans le temps selon la population de cellules, c'est-à-dire transfectées ou non. Pour déterminer le changement de structures secondaires, il suffit de procéder à des essais de clivage *in vitro* aux ribonucléases sur un ARN composant la particule PrP-RNP. De plus, il

serait important de déterminer si les cellules ayant la particule PrP-RNP ré-acquiert le phénotype de cellules souches. Certaines protéines sont spécifiques aux cellules souches comme les protéines Sox2 et Oct4. La présence de ces facteurs de transcription au sein des cellules transfectées confirmerait le phénotype de cellules souches. Il serait aussi intéressant de vérifier à l'aide de souris KO pour PrP^C, l'effet de la délétion de PrP^C au niveau de la spermatogénèse et plus particulièrement sur la formation du CB. Enfin, la présence de mi-ARN et des protéines associées au sein de PrP-RNP est très intéressante et nous suggère qu'il existe une relation entre PrP cytoplasmique et la voie des mi-ARNs. Il serait important d'approfondir cette relation afin de déterminer si la présence de PrP cytoplasmique induit la voie des mi-ARNs. Ceci pourrait être déterminé par l'identification et la quantification des mi-ARNs produits. De plus, l'identification des cibles et de l'effet de ces mi-ARNs sur le métabolisme des ARNs pourrait s'effectuer à partir des puces à ARNs.

4. Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Xavier Roucou pour m'avoir permis d'effectuer des travaux innovateurs dans le domaine de la protéine prion. Je remercie Catherine Grenier pour son assistance technique et pour la complétion de certaines expériences. Je remercie Benoit Vanderperre, de même que les stagiaires Isabelle Tremblay, Véronique Robert et Antanas Stackevicius pour leur contribution à ce projet. Je remercie aussi les Dr Léonid Volkov et Éric Bouchard pour leur assistance et leurs conseils. Finalement, je remercie les membres du jury Guylain Boissonneault et Nicolas Gévry pour avoir accepté de réviser ce mémoire. Ces travaux ont été subventionnés par les Institution de recherche en santé du Canada (IRSC) et PrioNet Canada.

5. Références

- Adler, V., B. Zeiler, V. Kryukov, R. Kasczak, R. Rubenstein, and A. Grossman. 2003. Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol* 332: 47-57.
- Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer. 2008. The Prion's Elusive Reason for Being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-77.
- Alfa Cisse, M., C. Sunyach, B. E. Slack, A. Fisher, B. Vincent, and F. Checler. 2007. M1 and M3 muscarinic receptors control physiological processing of cellular prion by modulating ADAM17 phosphorylation and activity. *J Neurosci* 27: 4083-92.
- Anderson, L., D. Rossi, J. Linehan, S. Brandner, and C. Weissmann. 2004. Transgene-driven expression of the Doppel protein in Purkinje cells causes Purkinje cell degeneration and motor impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3644-9.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2002a. Stressful initiations. *J Cell Sci* 115: 3227-34.
- . 2002b. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7: 213-21.
- . 2006. RNA granules. *J Cell Biol* 172: 803-8.
- Andonov, M. 1990. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Z Mikrosk Anat Forsch* 104: 46-54.
- Andonov, M. D., and G. N. Chaldakov. 1989. Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia* 45: 377-8.
- . 1991. Role of Ca²⁺ and cAMP in rat spermatogenesis--ultrastructural evidences. *Acta Histochem Suppl* 41: 55-63.
- Andrei, M. A., D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar, and R. Luhrmann. 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna* 11: 717-27.
- Ashraf, S. I., and S. Kunes. 2006. A trace of silence: memory and microRNA at the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 16: 535-9.
- Ashraf, S. I., A. L. McLoon, S. M. Sclarsic, and S. Kunes. 2006. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124: 191-205.
- Atarashi, R., N. Nishida, K. Shigematsu, S. Goto, T. Kondo, S. Sakaguchi, and S. Katamine. 2003. Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced Neurodegeneration. *J Biol Chem* 278: 28944-9.
- Aumiller, V., and K. Forstemann. 2008. Roles of microRNAs beyond development - Metabolism and neural plasticity. *Biochim Biophys Acta*.
- Aumuller, G., and J. Seitz. 1988. Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry* 89: 261-7.
- Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, and A. E. Pasquinelli. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122: 553-63.
- Bai, G., and S. A. Lipton. 1998. Aberrant RNA splicing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20: 363-6.
- Barenco, M. G., C. F. Valori, C. Roncoroni, J. Loewer, F. Montrasio, and D. Rossi. 2008. Deletion of the amino-terminal domain of the prion protein does not impair prion protein-dependent neuronal differentiation and neuritogenesis. *J Neurosci Res*.

- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-28.
- Bastian, F. O., D. E. Sanders, W. A. Forbes, S. D. Hagius, J. V. Walker, W. G. Henk, F. M. Enright, and P. H. Elzer. 2007. Spiroplasma spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants. *J Med Microbiol* 56: 1235-42.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde. 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20: 1885-98.
- Bence, N. F., R. M. Sampat, and R. R. Kopito. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-5.
- Beranger, F., A. Mange, B. Goud, and S. Lehmann. 2002. Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem* 277: 38972-7.
- Biggiogera, M., S. Fakan, G. Leser, T. E. Martin, and J. Gordon. 1990. Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Mol Reprod Dev* 26: 150-8.
- Bilen, J., N. Liu, B. G. Burnett, R. N. Pittman, and N. M. Bonini. 2006. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell* 24: 157-63.
- Bilinski, S. M., M. K. Jaglarz, B. Szymanska, L. D. Etkin, and M. Kloc. 2004. Sm proteins, the constituents of the spliceosome, are components of nuage and mitochondrial cement in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* 299: 171-8.
- Bommer, U. A., A. V. Borovjagin, M. A. Greagg, I. W. Jeffrey, P. Russell, K. G. Laing, M. Lee, and M. J. Clemens. 2002. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *Rna* 8: 478-96.
- Bragason, B. T., and A. Palsdottir. 2005. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 29: 232-44.
- Bramham, C. R., and D. G. Wells. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8: 776-89.
- Bratosiewicz-Wasik, J., T. J. Wasik, and P. P. Liberski. 2004. Molecular approaches to mechanisms of prion diseases. *Folia Neuropathol* 42 Suppl A: 33-46.
- Bregues, M., D. Teixeira, and R. Parker. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486-9.
- Breucker, H., E. Schafer, and A. F. Holstein. 1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res* 240: 303-9.
- Brown, D. R., and A. Besinger. 1998. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 334 (Pt 2): 423-9.
- Brownell, B., and D. R. Oppenheimer. 1965. An Ataxic Form of Subacute Presenile Polioencephalopathy (Creutzfeldt-Jakob Disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 28: 350-61.
- Bruno, I., and M. F. Wilkinson. 2006. P-bodies react to stress and nonsense. *Cell* 125: 1036-8.
- Budka, H. 1997. The human prion diseases: from neuropathology to pathobiology and molecular genetics. Final report of an EU concerted action. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 416-22.
- . 2000. Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Arch Virol Suppl*: 135-42.

- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-82.
- Burns, C. S., E. Aronoff-Spencer, C. M. Dunham, P. Lario, N. I. Avdievich, W. E. Antholine, M. M. Olmstead, A. Vrielink, G. J. Gerfen, J. Peisach, W. G. Scott, and G. L. Millhauser. 2002. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* 41: 3991-4001.
- Cande, C., N. Vahsen, D. Metivier, H. Tourriere, K. Chebli, C. Garrido, J. Tazi, and G. Kroemer. 2004. Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J Cell Sci* 117: 4461-8.
- Carp, R. I., H. Meeker, E. Sersen, and P. Kozlowski. 1998. Analysis of the incubation periods, induction of obesity and histopathological changes in senescence-prone and senescence-resistant mice infected with various scrapie strains. *J Gen Virol* 79 (Pt 11): 2863-9.
- Carp, R. I., H. C. Meeker, V. Caruso, and E. Sersen. 1999. Scrapie strain-specific interactions with endogenous murine leukaemia virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 1): 5-10.
- Carrera, P., O. Johnstone, A. Nakamura, J. Casanova, H. Jackle, and P. Lasko. 2000. VASA mediates translation through interaction with a Drosophila yIF2 homolog. *Mol Cell* 5: 181-7.
- Caughey, B. 1991. In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 93-107.
- Caughey, B., R. E. Race, D. Ernst, M. J. Buchmeier, and B. Chesebro. 1989. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* 63: 175-81.
- Chan, S. P., and F. J. Slack. 2006. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol* 3: 97-100.
- Chen, J. J. 2007. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 109: 2693-9.
- Clarke, G., R. A. Collins, B. R. Leavitt, D. F. Andrews, M. R. Hayden, C. J. Lumsden, and R. R. McInnes. 2000. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 406: 195-9.
- Cogswell, J. P., J. Ward, I. A. Taylor, M. Waters, Y. Shi, B. Cannon, K. Kelnar, J. Kempainen, D. Brown, C. Chen, R. K. Prinjha, J. C. Richardson, A. M. Saunders, A. D. Roses, and C. A. Richards. 2008. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis* 14: 27-41.
- Coller, J., and R. Parker. 2004. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* 73: 861-90.
- Collinge, S. B., J. Collinge, and J. G. Jefferys. 1996. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K+ currents. *Neurosci Lett* 209: 49-52.
- Collinge, J. 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 6: 1699-705.
- Collinge, J., and M. S. Palmer. 1994. Molecular genetics of human prion diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343: 371-8.
- Collinge, J., M. S. Palmer, and A. J. Dryden. 1991. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337: 1441-2.
- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke, and J. G. Jefferys. 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-7.
- Combs, C. K., D. E. Johnson, S. B. Cannady, T. M. Lehman, and G. E. Landreth. 1999. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic

- response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J Neurosci* 19: 928-39.
- Comings, D. E., and T. A. Okada. 1972. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J Ultrastruct Res* 39: 15-23.
- Cordeiro, Y., L. M. Lima, M. P. Gomes, D. Foguel, and J. L. Silva. 2004. Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *J Biol Chem* 279: 5346-52.
- Cordeiro, Y., F. Machado, L. Juliano, M. A. Juliano, R. R. Brentani, D. Foguel, and J. L. Silva. 2001. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* 276: 49400-9.
- Cordeiro, Y., and J. L. Silva. 2005. The hypothesis of the catalytic action of nucleic acid on the conversion of prion protein. *Protein Pept Lett* 12: 251-5.
- Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 165: 31-40.
- Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, B. Conti, J. L. Giacchino, D. N. Wills, S. J. Henriksen, R. Race, J. C. Manson, B. Chesebro, and M. B. Oldstone. 2005. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19: 255-65.
- Crozet, C., F. Beranger, and S. Lehmann. 2008. Cellular pathogenesis in prion diseases. *Vet Res* 39: 44.
- Crozet, C., J. Vezilier, V. Delfieu, T. Nishimura, T. Onodera, D. Casanova, S. Lehmann, and F. Beranger. 2006. The truncated 23-230 form of the prion protein localizes to the nuclei of inducible cell lines independently of its nuclear localization signals and is not cytotoxic. *Mol Cell Neurosci* 32: 315-23.
- Dang, Y., N. Kedersha, W. K. Low, D. Romo, M. Gorospe, R. Kaufman, P. Anderson, and J. O. Liu. 2006. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* 281: 32870-8.
- Daoust, R., and Y. Clermont. 1955. Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat* 96: 255-83.
- Darnell, R. B. 2003. Memory, synaptic translation, and...prions? *Cell* 115: 767-8.
- de Almeida, C. J., L. B. Chiarini, J. P. da Silva, E. S. PM, M. A. Martins, and R. Linden. 2005. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* 77: 238-46.
- Deleault, N. R., J. C. Geoghegan, K. Nishina, R. Kascsak, R. A. Williamson, and S. Supattapone. 2005. Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* 280: 26873-9.
- Deleault, N. R., B. T. Harris, J. R. Rees, and S. Supattapone. 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9741-6.
- Deleault, N. R., R. W. Lucassen, and S. Supattapone. 2003. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-20.
- Derrington, E., C. Gabus, P. Leblanc, J. Chnaidermann, L. Grave, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, D. Marck, P. Nandi, and J. L. Darlix. 2002. PrPC has nucleic acid chaperoning properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1. *C R Biol* 325: 17-23.
- Ding, X. C., F. J. Slack, and H. Grosshans. 2008. The let-7 microRNA interfaces extensively with the translation machinery to regulate cell differentiation. *Cell Cycle* 7.
- Donne, D. G., J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster

- prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13452-7.
- Drisaldi, B., J. Coomaraswamy, P. Mastrangelo, B. Strome, J. Yang, J. C. Watts, M. A. Chishti, M. Marvi, O. Windl, R. Ahrens, F. Major, M. S. Sy, H. Kretzschmar, P. E. Fraser, H. T. Mount, and D. Westaway. 2004. Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrPC offset proapoptotic activity of the Doppel helix B/B' region. *J Biol Chem* 279: 55443-54.
- Durand, S., N. Cougot, F. Mahuteau-Betzer, C. H. Nguyen, D. S. Grierson, E. Bertrand, J. Tazi, and F. Lejeune. 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* 178: 1145-60.
- Eddy, E. M. 1970. Cytochemical observations on the chromatoid body of the male germ cells. *Biol Reprod* 2: 114-28.
- . 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 43: 229-80.
- Eggert, C., A. Chari, B. Laggerbauer, and U. Fischer. 2006. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* 12: 113-21.
- Endo, T., D. Groth, S. B. Prusiner, and A. Kobata. 1989. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28: 8380-8.
- Ermonval, M., S. Mouillet-Richard, P. Codogno, O. Kellermann, and J. Botti. 2003. Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie* 85: 33-45.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde. 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde. 2007b. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27: 3970-81.
- Eulalio, A., J. Rehwinkel, M. Stricker, E. Huntzinger, S. F. Yang, T. Doerks, S. Dorner, P. Bork, M. Boutros, and E. Izaurralde. 2007c. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21: 2558-70.
- Fagard, R., and I. M. London. 1981. Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 866-70.
- Fawcett, D. W., E. M. Eddy, and D. M. Phillips. 1970. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* 2: 129-53.
- Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, and G. Raposo. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683-8.
- Fevrier, B., D. Vilette, H. Laude, and G. Raposo. 2005. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 6: 10-7.
- Figuroa, J., and L. O. Burzio. 1998. Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res* 291: 575-9.
- Filipowicz, W., L. Jaskiewicz, F. A. Kolb, and R. S. Pillai. 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15: 331-41.
- Fiore, R., G. Siegel, and G. Schratt. 2008. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1779: 471-8.
- Fioriti, L., S. Dossena, L. R. Stewart, R. S. Stewart, D. A. Harris, G. Forloni, and R. Chiesa. 2005. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J Biol Chem* 280: 11320-8.

- Fortun, J., W. A. Dunn, Jr., S. Joy, J. Li, and L. Notterpek. 2003. Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci* 23: 10672-80.
- Fortun, J., J. D. Verrier, J. C. Go, I. Madorsky, W. A. Dunn, and L. Notterpek. 2007. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis* 25: 252-65.
- Freixes, M., B. Puig, A. Rodriguez, B. Torrejon-Escribano, R. Blanco, and I. Ferrer. 2004. Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 108: 295-301.
- Fukuhara, N., J. Ebert, L. Unterholzner, D. Lindner, E. Izaurralde, and E. Conti. 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* 17: 537-47.
- Gabriel, J. M., B. Oesch, H. Kretzschmar, M. Scott, and S. B. Prusiner. 1992. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9097-101.
- Gabus, C., E. Derrington, P. Leblanc, J. Chnaiderman, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. K. Surewicz, D. Marc, P. Nandi, and J. L. Darlix. 2001. The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* 276: 19301-9.
- Gains, M. J., K. A. Roth, and A. C. LeBlanc. 2006. Prion protein protects against ethanol-induced Bax-mediated cell death in vivo. *Neuroreport* 17: 903-6.
- Gajdusek, D. C., and M. Alpers. 1972. Genetic studies in relation of kuru. I. Cultural, historical, and demographic background. *Am J Hum Genet* 24: Suppl:1-38.
- Galabru, J., and A. Hovanessian. 1987. Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem* 262: 15538-44.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, M. G. Stenberg, M. S. Swanson, A. Eversole, N. Maizels, and J. A. Steitz. 2000. HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3073-8.
- Gambetti, P., Q. Kong, W. Zou, P. Parchi, and S. G. Chen. 2003. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66: 213-39.
- Garcia-Mata, R., Z. Bebok, E. J. Sorscher, and E. S. Sztul. 1999. Characterization and dynamics of aggregate formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146: 1239-54.
- Garcia-Mata, R., Y. S. Gao, and E. Sztul. 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggregates. *Traffic* 3: 388-96.
- Geoghegan, J. C., P. A. Valdes, N. R. Orem, N. R. Deleault, R. A. Williamson, B. T. Harris, and S. Supattapone. 2007. Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions. *J Biol Chem* 282: 36341-53.
- Ghetti, B., S. R. Dlouhy, G. Giaccone, O. Bugiani, B. Frangione, M. R. Farlow, and F. Tagliavini. 1995. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol* 5: 61-75.
- Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L. M. Dember, and P. Anderson. 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15: 5383-98.
- Glatz, D. C., D. Rujescu, Y. Tang, F. J. Berendt, A. M. Hartmann, F. Faltraco, C. Rosenberg, C. Hulette, K. Jellinger, H. Hampel, P. Riederer, H. J. Moller, A. Andreadis, K. Henkel, and S. Stamm. 2006. The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96: 635-44.
- Glatzel, M., K. Stoeck, H. Seeger, T. Luhrs, and A. Aguzzi. 2005. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 62: 545-52.

- Goggin, K., S. Beaudoin, C. Grenier, A. A. Brown, and X. Roucou. 2008. Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim Biophys Acta* 1783: 479-91.
- Goldfarb, L. G., P. Brown, W. R. McCombie, D. Goldgaber, G. D. Swergold, P. R. Wills, L. Cervenakova, H. Baron, C. J. Gibbs, Jr., and D. C. Gajdusek. 1991. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10926-30.
- Goldfarb, L. G., E. Mitrova, P. Brown, B. K. Toh, and D. C. Gajdusek. 1990. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. *Lancet* 336: 514-5.
- Goldfarb, L. G., R. B. Petersen, M. Tabaton, P. Brown, A. C. LeBlanc, P. Montagna, P. Cortelli, J. Julien, C. Vital, W. W. Pendelbury, and et al. 1992. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258: 806-8.
- Gomes, M. P., T. A. Millen, P. S. Ferreira, N. L. e Silva, T. C. Vieira, M. S. Almeida, J. L. Silva, and Y. Cordeiro. 2008. Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283: 19616-25.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V. R. Martins, and R. R. Brentani. 2000. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 85-92.
- Grenier, C., C. Bissonnette, L. Volkov, and X. Roucou. 2006. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem* 97: 1456-66.
- Grune, T., T. Jung, K. Merker, and K. J. Davies. 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2519-30.
- Gu, Y., J. Hinnerwisch, R. Fredricks, S. Kalepu, R. S. Mishra, and N. Singh. 2003. Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis* 12: 133-49.
- Hachiya, N. S., M. Imagawa, and K. Kaneko. 2007. The possible role of protein X, a putative auxiliary factor in pathological prion replication, in regulating a physiological endoproteolytic cleavage of cellular prion protein. *Med Hypotheses* 68: 670-3.
- Hachiya, N. S., K. Watanabe, M. Y. Kawabata, A. Jozuka, Y. Kozuka, Y. Sakasegawa, and K. Kaneko. 2005. Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 894-9.
- Hachiya, N. S., K. Watanabe, Y. Sakasegawa, and K. Kaneko. 2004a. Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 818-23.
- Hachiya, N. S., K. Watanabe, M. Yamada, Y. Sakasegawa, and K. Kaneko. 2004b. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 802-7.
- Haraguchi, C. M., T. Mabuchi, S. Hirata, T. Shoda, K. Hoshi, K. Akasaki, and S. Yokota. 2005. Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J Histochem Cytochem* 53: 455-65.
- Haraguchi, T., S. Fisher, S. Olofsson, T. Endo, D. Groth, A. Tarentino, D. R. Borchelt, D. Teplow, L. Hood, A. Burlingame, and et al. 1989. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274: 1-13.

- Harder, A., K. Jendroska, F. Kreuz, T. Wirth, C. Schafranka, N. Karnatz, A. Theallier-Janko, J. Dreier, K. Lohan, D. Emmerich, J. Cervos-Navarro, O. Windl, H. A. Kretzschmar, P. Nurnberg, and R. Witkowski. 1999. Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet* 87: 311-6.
- Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron. 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5: 897-904.
- Harding, H. P., Y. Zhang, and D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271-4.
- Harris, D. A. 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66: 71-85.
- Hay, B., L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 1988. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55: 577-87.
- Head, M. W., E. Corbin, and J. E. Goldman. 1994. Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J Cell Physiol* 159: 41-50.
- Hebert, S. S., and B. De Strooper. 2007. Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration. *Science* 317: 1179-80.
- Hebert, S. S., K. Horre, L. Nicolai, A. S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A. N. Silahatoglu, S. Kauppinen, A. Delacourte, and B. De Strooper. 2008. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6415-20.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa. 1998. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-34.
- Hegner, R. W. 1911. The Germ Cell Determinants in the Eggs of Chrysomelid Beetles. *Science* 33: 71-72.
- Helmus, J. J., K. Surewicz, P. S. Nadaud, W. K. Surewicz, and C. P. Jaroniec. 2008. Molecular conformation and dynamics of the Y145Stop variant of human prion protein in amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6284-9.
- Herms, J. W., A. Madlung, D. R. Brown, and H. A. Kretzschmar. 1997. Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* 21: 253-7.
- Heske, J., U. Heller, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2004. The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 5435-43.
- Hetz, C., J. Castilla, and C. Soto. 2007. Perturbation of endoplasmic reticulum homeostasis facilitates prion replication. *J Biol Chem* 282: 12725-33.
- Hillebrand, J., S. A. Barbee, and M. Ramaswami. 2007. P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal* 7: 178-90.
- Hooper, N. M. 2005. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans* 33: 335-8.
- Hoshino, S., K. Inoue, T. Yokoyama, S. Kobayashi, T. Asakura, A. Teramoto, and S. Itohara. 2003. Prions prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary report. *Acta Neurochir Suppl* 86: 297-9.
- Hosokawa, T., K. Tsuchiya, I. Sato, N. Takeyama, S. Ueda, Y. Tagawa, K. M. Kimura, I. Nakamura, G. Wu, A. Sakudo, C. Casalone, M. Mazza, M. Caramelli, H. Takahashi, T. Sata, K. Sugiura, A. Baj, A. Toniolo, and T. Onodera. 2008. A monoclonal

- antibody (1D12) defines novel distribution patterns of prion protein (PrP) as granules in nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 657-63.
- Hovanessian, A. G., and J. Galabru. 1987. The double-stranded RNA-dependent protein kinase is also activated by heparin. *Eur J Biochem* 167: 467-73.
- Hsiao, K., Z. Meiner, E. Kahana, C. Cass, I. Kahana, D. Avrahami, G. Scarlato, O. Abramsky, S. B. Prusiner, and R. Gabizon. 1991. Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 324: 1091-7.
- Hu, J. Y., X. Meng, and S. Schacher. 2003. Redistribution of syntaxin mRNA in neuronal cell bodies regulates protein expression and transport during synapse formation and long-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 23: 1804-15.
- Hu, W., B. Kieseier, E. Frohman, T. N. Eagar, R. N. Rosenberg, H. P. Hartung, and O. Stuve. 2008. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J Neurol Sci* 264: 1-8.
- Hua, Y., and J. Zhou. 2004. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett* 572: 69-74.
- Ingelfinger, D., D. J. Arndt-Jovin, R. Luhrmann, and T. Achsel. 2002. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *Rna* 8: 1489-501.
- Ito, T., M. Yang, and W. S. May. 1999. RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem* 274: 15427-32.
- Ivanov, P. A., E. M. Chudinova, and E. S. Nadezhdina. 2003a. Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. *Exp Cell Res* 290: 227-33.
- . 2003b. RNP stress-granule formation is inhibited by microtubule disruption. *Cell Biol Int* 27: 207-8.
- Iwasaki, M., K. Okumura, Y. Kondo, T. Tanaka, and H. Igarashi. 1992. cDNA cloning of a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein gene homologue in *Caenorhabditis elegans* using hamster prion protein cDNA as a hybridization probe. *Nucleic Acids Res* 20: 4001-7.
- Iwata, A., B. E. Riley, J. A. Johnston, and R. R. Kopito. 2005. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 280: 40282-92.
- Jackson, G. S., I. Murray, L. L. Hosszu, N. Gibbs, J. P. Waltho, A. R. Clarke, and J. Collinge. 2001. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8531-5.
- Jaegly, A., F. Boussin, J. P. Deslys, and D. Dormont. 1995. Human growth hormone-related iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: search for a genetic susceptibility by analysis of the PRNP coding region. *Genomics* 27: 382-3.
- Jakymiw, A., S. Lian, T. Eystathioy, S. Li, M. Satoh, J. C. Hamel, M. J. Fritzler, and E. K. Chan. 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7: 1267-74.
- Jakymiw, A., K. M. Pauley, S. Li, K. Ikeda, S. Lian, T. Eystathioy, M. Satoh, M. J. Fritzler, and E. K. Chan. 2007. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci* 120: 1317-23.
- Jiang, H. Y., and R. C. Wek. 2005. GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J* 385: 371-80.
- Jing, Q., S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. Di Padova, S. C. Lin, H. Gram, and J. Han. 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623-34.

- Johnson, R., C. Zuccato, N. D. Belyaev, D. J. Guest, E. Cattaneo, and N. J. Buckley. 2008. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 29: 438-45.
- Johnston, J. A., M. J. Dalton, M. E. Gurney, and R. R. Kopito. 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12571-6.
- Johnston, J. A., M. E. Illing, and R. R. Kopito. 2002. Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motil Cytoskeleton* 53: 26-38.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, and R. R. Kopito. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143: 1883-98.
- Jones, K. W., K. Gorzynski, C. M. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, R. M. Terns, and M. P. Terns. 2001. Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem* 276: 38645-51.
- Jousse, C., S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H. P. Harding, and D. Ron. 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163: 767-75.
- Jud, M. C., M. J. Czerwinski, M. P. Wood, R. A. Young, C. M. Gallo, J. S. Bickel, E. L. Petty, J. M. Mason, B. A. Little, P. A. Padilla, and J. A. Schisa. 2008. Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol* 318: 38-51.
- Junn, E., S. S. Lee, U. T. Suhr, and M. M. Mouradian. 2002. Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J Biol Chem* 277: 47870-7.
- Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1997. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10069-74.
- Kar, A., N. Havlioglu, W. Y. Tarn, and J. Y. Wu. 2006. RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 281: 24479-88.
- Karres, J. S., V. Hilgers, I. Carrera, J. Treisman, and S. M. Cohen. 2007. The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell* 131: 136-45.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, A. McLaurin, J. M. Vance, A. Ito, and T. P. Yao. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115: 727-38.
- Kawakami, A., Q. Tian, X. Duan, M. Streuli, S. F. Schlossman, and P. Anderson. 1992. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8681-5.
- Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-9.
- . 2007. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431: 61-81.
- Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I. J. Miller, J. Stahl, and P. Anderson. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 13: 195-210.
- Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D. E. Golan, and P. Anderson. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol* 151: 1257-68.

- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-84.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147: 1431-42.
- Kellings, K., S. B. Prusiner, and D. Riesner. 1994. Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343: 425-30.
- Kikuchi, Y., T. Takeya, O. Nakajima, A. Sakai, K. Ikeda, N. Yamaguchi, T. Yamazaki, K. Tanamoto, H. Matsuda, J. Sawada, and K. Takatori. 2008. Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein. *Febs J* 275: 2965-76.
- Kim, S. H., W. K. Dong, I. J. Weiler, and W. T. Greenough. 2006. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. *J Neurosci* 26: 2413-8.
- Kimball, S. R., R. L. Horetsky, D. Ron, L. S. Jefferson, and H. P. Harding. 2003. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C273-84.
- King, D. J., J. G. Safar, G. Legname, and S. B. Prusiner. 2007. Thioaptamer interactions with prion proteins: sequence-specific and non-specific binding sites. *J Mol Biol* 369: 1001-14.
- Klamt, F., F. Dal-Pizzol, M. J. Conte da Frota, R. Walz, M. E. Andrades, E. G. da Silva, R. R. Brentani, I. Izquierdo, and J. C. Fonseca Moreira. 2001. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30: 1137-44.
- Kocisko, D. A., A. Vaillant, K. S. Lee, K. M. Arnold, N. Bertholet, R. E. Race, E. A. Olsen, J. M. Juteau, and B. Caughey. 2006. Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1034-44.
- Kopito, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10: 524-30.
- Kopito, R. R., and R. Sitia. 2000. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep* 1: 225-31.
- Kotaja, N., S. N. Bhattacharyya, L. Jaskiewicz, S. Kimmins, M. Parvinen, W. Filipowicz, and P. Sassone-Corsi. 2006a. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2647-52.
- Kotaja, N., H. Lin, M. Parvinen, and P. Sassone-Corsi. 2006b. Interplay of PIWI/Argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J Cell Sci* 119: 2819-25.
- Kotaja, N., and P. Sassone-Corsi. 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 85-90.
- Kramer, M. L., H. D. Kratzin, B. Schmidt, A. Romer, O. Windl, S. Liemann, S. Hornemann, and H. Kretzschmar. 2001. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* 276: 16711-9.
- Krimer, D. B., and P. Esponda. 1980. Presence of polysaccharides and proteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Cell Biol Int Rep* 4: 265-70.
- Krishnamoorthy, T., G. D. Pavitt, F. Zhang, T. E. Dever, and A. G. Hinnebusch. 2001. Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the

- regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol* 21: 5018-30.
- Kristiansen, M., P. Deriziotis, D. E. Dimcheff, G. S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A. R. Clarke, F. W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N. P. Dantuma, J. L. Portis, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2007. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* 26: 175-88.
- Kristiansen, M., M. J. Messenger, P. C. Klohn, S. Brandner, J. D. Wadsworth, J. Collinge, and S. J. Tabrizi. 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280: 38851-61.
- Kubosaki, A., Y. Nishimura-Nasu, T. Nishimura, S. Yusa, A. Sakudo, K. Saeki, Y. Matsumoto, S. Itohara, and T. Onodera. 2003. Expression of normal cellular prion protein (PrP(c)) on T lymphocytes and the effect of copper ion: Analysis by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 810-3.
- Kudlicki, W., R. E. Wettenhall, B. E. Kemp, R. Szyszka, G. Kramer, and B. Hardesty. 1987. Evidence for a second phosphorylation site on eIF-2 alpha from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett* 215: 16-20.
- Landolt, H. P., M. Glatzel, T. Blattler, P. Achermann, C. Roth, J. Mathis, J. Weis, I. Tobler, A. Aguzzi, and C. L. Bassetti. 2006. Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 66: 1418-24.
- Laplanche, J. L., J. Chatelain, J. M. Launay, C. Gazengel, and M. Vidaud. 1990. Deletion in prion protein gene in a Moroccan family. *Nucleic Acids Res* 18: 6745.
- Lasko, P. F., and M. Ashburner. 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335: 611-7.
- Latreille, M., and L. Larose. 2006. Nck in a complex containing the catalytic subunit of protein phosphatase 1 regulates eukaryotic initiation factor 2alpha signaling and cell survival to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 281: 26633-44.
- Lebeau, G., M. Maher-Laporte, L. Topolnik, C. E. Laurent, W. Sossin, L. Desgroseillers, and J. C. Lacaille. 2008. Stauf1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28: 2896-907.
- Leblanc, P., S. Alais, I. Porto-Carreiro, S. Lehmann, J. Grassi, G. Raposo, and J. L. Darlix. 2006. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *Embo J* 25: 2674-85.
- Leblanc, P., D. Baas, and J. L. Darlix. 2004. Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line. *J Mol Biol* 337: 1035-51.
- Lee, I. Y., D. Westaway, A. F. Smit, K. Wang, J. Seto, L. Chen, C. Acharya, M. Ankener, D. Baskin, C. Cooper, H. Yao, S. B. Prusiner, and L. E. Hood. 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 8: 1022-37.
- Lee, J. I., J. E. Dominy, Jr., A. K. Sikalidis, L. L. Hirschberger, W. Wang, and M. H. Stipanuk. 2008. HepG2/C3A cells respond to cysteine deprivation by induction of the amino acid deprivation/integrated stress response pathway. *Physiol Genomics* 33: 218-29.
- Lee, K. S., A. C. Magalhaes, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins, and M. A. Prado. 2001. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79: 79-87.
- Liang, L., W. Diehl-Jones, and P. Lasko. 1994. Localization of *vasa* protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120: 1201-11.

- Liao, Y. C., R. V. Lebo, G. A. Clawson, and E. A. Smuckler. 1986. Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233: 364-7.
- Lima, L. M., Y. Cordeiro, L. W. Tinoco, A. F. Marques, C. L. Oliveira, S. Sampath, R. Kodali, G. Choi, D. Foguel, I. Torriani, B. Caughey, and J. L. Silva. 2006. Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry* 45: 9180-7.
- Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, and X. K. Zhang. 2004. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116: 527-40.
- Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen. 2006. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 13: 385-92.
- Lipp, H. P., M. Stagliar-Bozicevic, M. Fischer, and D. P. Wolfer. 1998. A 2-year longitudinal study of swimming navigation in mice devoid of the prion protein: no evidence for neurological anomalies or spatial learning impairments. *Behav Brain Res* 95: 47-54.
- Liu, F., and C. X. Gong. 2008. Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol Neurodegener* 3: 8.
- Liu, J., F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates, 3rd, R. Parker, and G. J. Hannon. 2005a. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7: 1261-6.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, and R. Parker. 2005b. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7: 719-23.
- Liu, J. L., and J. G. Gall. 2007. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11655-9.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang, and G. Dreyfuss. 1997. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90: 1013-21.
- Lledo, P. M., P. Tremblay, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and R. A. Nicoll. 1996. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2403-7.
- Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden, and V. R. Martins. 2005. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25: 11330-9.
- Lopez Garcia, F., R. Zahn, R. Riek, and K. Wuthrich. 2000. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8334-9.
- Lotscher, M., M. Recher, K. S. Lang, A. Navarini, L. Hunziker, R. Santimaria, M. Glatzel, P. Schwarz, J. Boni, and R. M. Zinkernagel. 2007. Induced prion protein controls immune-activated retroviruses in the mouse spleen. *PLoS ONE* 2: e1158.
- Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi, and P. Gambetti. 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315: 997-1003.
- Lugaresi, E., I. Tobler, P. Gambetti, and P. Montagna. 1998. The pathophysiology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 8: 521-6.
- Lundberg, P., M. Magzoub, M. Lindberg, M. Hallbrink, J. Jarvet, L. E. Eriksson, U. Langel, and A. Graslund. 2002. Cell membrane translocation of the N-terminal (1-28) part of the prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 85-90.

- Lyonnais, S., R. J. Gorelick, J. L. Mergny, E. Le Cam, and G. Mirambeau. 2003. G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 31: 5754-63.
- Ma, J., and S. Lindquist. 2001. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14955-60.
- . 2002. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* 298: 1785-8.
- Ma, J., R. Wollmann, and S. Lindquist. 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298: 1781-5.
- Maes, O. C., J. An, H. Sarojini, and E. Wang. 2008. Murine microRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech Ageing Dev* 129: 534-41.
- Magalhaes, A. C., J. A. Silva, K. S. Lee, V. R. Martins, V. F. Prado, S. S. Ferguson, M. V. Gomez, R. R. Brentani, and M. A. Prado. 2002. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 33311-8.
- Magzoub, M., S. Sandgren, P. Lundberg, K. Oglecka, J. Lilja, A. Wittrup, L. E. Goran Eriksson, U. Langel, M. Belting, and A. Graslund. 2006. N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 379-85.
- Mahal, S. P., E. A. Asante, M. Antoniou, and J. Collinge. 2001. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 268: 105-14.
- Mallucci, G., A. Dickinson, J. Linehan, P. C. Klohn, S. Brandner, and J. Collinge. 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871-4.
- Mallucci, G. R., S. Ratte, E. A. Asante, J. Linehan, I. Gowland, J. G. Jefferys, and J. Collinge. 2002. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo J* 21: 202-10.
- Malolepsza, E., M. Boniecki, A. Kolinski, and L. Piela. 2005. Theoretical model of prion propagation: a misfolded protein induces misfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7835-40.
- Mange, A., F. Beranger, K. Peoc'h, T. Onodera, Y. Frobert, and S. Lehmann. 2004a. Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96: 125-32.
- Mange, A., C. Crozet, S. Lehmann, and F. Beranger. 2004b. Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. *J Cell Sci* 117: 2411-6.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell, and J. Hope. 1994. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8: 121-7.
- Manson, J. C., J. Hope, A. R. Clarke, A. Johnston, C. Black, and N. MacLeod. 1995. PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 4: 113-4.
- Marc, D., R. Mercey, and F. Lantier. 2007. Scavenger, transducer, RNA chaperone? What ligands of the prion protein teach us about its function. *Cell Mol Life Sci* 64: 815-29.
- Maxwell, C. R., and M. Rabinovitz. 1969. Evidence for an inhibitor in the control of globin synthesis by hemin in a reticulocyte lysate. *Biochem Biophys Res Commun* 35: 79-85.
- Mazroui, R., R. Sukarieh, M. E. Bordeleau, R. J. Kaufman, P. Northcote, J. Tanaka, I. Gallouzi, and J. Pelletier. 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress

- granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* 17: 4212-9.
- McKnight, S., and R. Tjian. 1986. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46: 795-805.
- McLennan, N. F., P. M. Brennan, A. McNeill, I. Davies, A. Fotheringham, K. A. Rennison, D. Ritchie, F. Brannan, M. W. Head, J. W. Ironside, A. Williams, and J. E. Bell. 2004. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 165: 227-35.
- McMahon, H. E., A. Mange, N. Nishida, C. Creminon, D. Casanova, and S. Lehmann. 2001. Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 276: 2286-91.
- Mead, S., M. P. Stumpf, J. Whitfield, J. A. Beck, M. Poulter, T. Campbell, J. B. Uphill, D. Goldstein, M. Alpers, E. M. Fisher, and J. Collinge. 2003. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 300: 640-3.
- Medori, R., P. Montagna, H. J. Tritschler, A. LeBlanc, P. Cortelli, P. Tinuper, E. Lugaresi, and P. Gambetti. 1992. Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42: 669-70.
- Meister, G., M. Landthaler, L. Peters, P. Y. Chen, H. Urlaub, R. Luhrmann, and T. Tuschl. 2005. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 15: 2149-55.
- Meister, G., and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-9.
- Mercey, R., I. Lantier, M. C. Maurel, J. Grosclaude, F. Lantier, and D. Marc. 2006. Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns. *Arch Virol* 151: 2197-214.
- Meyer, T., A. Fromm, C. Munch, B. Schwalenstocker, A. E. Fray, P. G. Ince, S. Stamm, G. Gron, A. C. Ludolph, and P. J. Shaw. 1999. The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J Neurol Sci* 170: 45-50.
- Mironov, A., Jr., D. Latawiec, H. Wille, E. Bouzamondo-Bernstein, G. Legname, R. A. Williamson, D. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and P. J. Peters. 2003. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 23: 7183-93.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood, and D. Westaway. 1999. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 292: 797-817.
- Moscardini, M., M. Pistello, M. Bendinelli, D. Ficheux, J. T. Miller, C. Gabus, S. F. Le Grice, W. K. Surewicz, and J. L. Darlix. 2002. Functional interactions of nucleocapsid protein of feline immunodeficiency virus and cellular prion protein with the viral RNA. *J Mol Biol* 318: 149-59.
- Moussa, F., R. Oko, and L. Hermo. 1994. The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Cell Tissue Res* 278: 363-78.
- Munch, C., M. Ebstein, U. Seefried, B. Zhu, S. Stamm, G. B. Landwehrmeyer, A. C. Ludolph, B. Schwalenstocker, and T. Meyer. 2002. Alternative splicing of the 5'-sequences of the mouse EAAT2 glutamate transporter and expression in a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 82: 594-603.

- Nakai, A., and T. Ishikawa. 2000. A nuclear localization signal is essential for stress-induced dimer-to-trimer transition of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 275: 34665-71.
- Namekata, K., N. Nishimura, and H. Kimura. 2002. Presenilin-binding protein forms aggregates in monkey kidney COS-7 cells. *J Neurochem* 82: 819-27.
- Nandi, P. K. 1997. Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid. *Arch Virol* 142: 2537-45.
- Nandi, P. K., and E. Leclerc. 1999. Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution. *Arch Virol* 144: 1751-63.
- Nandi, P. K., E. Leclerc, J. C. Nicole, and M. Takahashi. 2002. DNA-induced partial unfolding of prion protein leads to its polymerisation to amyloid. *J Mol Biol* 322: 153-61.
- Nandi, P. K., and J. C. Nicole. 2004. Nucleic acid and prion protein interaction produces spherical amyloids which can function in vivo as coats of spongiform encephalopathy agent. *J Mol Biol* 344: 827-37.
- Nandi, P. K., and P. Y. Sizaret. 2001. Murine recombinant prion protein induces ordered aggregation of linear nucleic acids to condensed globular structures. *Arch Virol* 146: 327-45.
- Negro, A., C. Ballarin, A. Bertoli, M. L. Massimino, and M. C. Sorgato. 2001. The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci* 17: 521-38.
- Nelson, P. T., W. X. Wang, and B. W. Rajeev. 2008. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 18: 130-8.
- Nishida, N., S. Katamine, K. Shigematsu, A. Nakatani, N. Sakamoto, S. Hasegawa, R. Nakaoka, R. Atarashi, Y. Kataoka, and T. Miyamoto. 1997. Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Mol Neurobiol* 17: 537-45.
- Nishida, N., P. Tremblay, T. Sugimoto, K. Shigematsu, S. Shirabe, C. Petromilli, S. P. Erpel, R. Nakaoka, R. Atarashi, T. Houtani, M. Torchia, S. Sakaguchi, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and S. Katamine. 1999. A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* 79: 689-97.
- Noce, T., S. Okamoto-Ito, and N. Tsunekawa. 2001. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct Funct* 26: 131-6.
- Norstrom, E. M., M. F. Ciaccio, B. Rassbach, R. Wollmann, and J. A. Mastrianni. 2007. Cytosolic prion protein toxicity is independent of cellular prion protein expression and prion propagation. *J Virol* 81: 2831-7.
- Novoa, I., H. Zeng, H. P. Harding, and D. Ron. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153: 1011-22.
- Novoa, I., Y. Zhang, H. Zeng, R. Jungreis, H. P. Harding, and D. Ron. 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J* 22: 1180-7.
- Nunziante, M., S. Gilch, and H. M. Schatzl. 2003. Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J Biol Chem* 278: 3726-34.
- Oglecka, K., P. Lundberg, M. Magzoub, L. E. Goran Eriksson, U. Langel, and A. Graslund. 2008. Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects. *Biochim Biophys Acta* 1778: 206-13.

- Oh, P., and J. E. Schnitzer. 2001. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* 12: 685-98.
- Oko, R., R. Korley, M. T. Murray, N. B. Hecht, and L. Hermo. 1996. Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. *Mol Reprod Dev* 44: 1-13.
- Olzmann, J. A., and L. S. Chin. 2008. Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy* 4: 85-7.
- Olzmann, J. A., L. Li, and L. S. Chin. 2008. Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 15: 47-60.
- Orengo, J. P., and T. A. Cooper. 2007. Alternative splicing in disease. *Adv Exp Med Biol* 623: 212-23.
- Orsi, A., L. Fioriti, R. Chiesa, and R. Sitia. 2006. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem* 281: 30431-8.
- Owen, F., M. Poulter, R. Lofthouse, J. Collinge, T. J. Crow, D. Risby, H. F. Baker, R. M. Ridley, K. Hsiao, and S. B. Prusiner. 1989. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1: 51-2.
- Padovani, A., M. D'Alessandro, P. Parchi, P. Cortelli, G. P. Anzola, P. Montagna, L. A. Vignolo, R. Petraroli, M. Pocchiari, E. Lugaresi, and P. Gambetti. 1998. Fatal familial insomnia in a new Italian kindred. *Neurology* 51: 1491-4.
- Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes, and J. Collinge. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352: 340-2.
- Palpers, M. 2005. The epidemiology of kuru in the period 1987 to 1995. *Commun Dis Intell* 29: 391-9.
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, and et al. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10962-6.
- Pan, T., B. S. Wong, T. Liu, R. Li, R. B. Petersen, and M. S. Sy. 2002. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* 368: 81-90.
- Paniagua, R., M. Nistal, P. Amat, and M. C. Rodriguez. 1985. Presence of ribonucleoproteins and basic proteins in the nuage and intermitochondrial bars of human spermatogonia. *J Anat* 143: 201-6.
- . 1986. Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 174: 301-6.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, and T. Johansen. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-45.
- Papassotiropoulos, A., M. A. Wollmer, A. Aguzzi, C. Hock, R. M. Nitsch, and D. J. de Quervain. 2005. The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet* 14: 2241-6.
- Park, K. W., and L. Li. 2008. Cytoplasmic expression of mouse prion protein causes severe toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 697-702.
- Parker, R., and U. Sheth. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-46.
- Parker, S. H., T. A. Parker, K. S. George, and S. Wu. 2006. The roles of translation initiation regulation in ultraviolet light-induced apoptosis. *Mol Cell Biochem* 293: 173-81.

- Parsons, M. J., C. H. Grimm, J. L. Paya-Cano, K. Sugden, W. Nietfeld, H. Lehrach, and L. C. Schalkwyk. 2008. Using hippocampal microRNA expression differences between mouse inbred strains to characterise miRNA function. *Mamm Genome*.
- Parvinen, M. 2005. The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl* 28: 189-201.
- Parvinen, M., and P. T. Jokelainen. 1974. Rapid movements of the chromatoid body in living early spermatids of the rat. *Biol Reprod* 11: 85-92.
- Parvinen, M., and L. M. Parvinen. 1979. Active movements of the chromatoid body. A possible transport mechanism for haploid gene products. *J Cell Biol* 80: 621-8.
- Pasinelli, P., M. E. Belford, N. Lennon, B. J. Bacsikai, B. T. Hyman, D. Trotti, and R. H. Brown, Jr. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43: 19-30.
- Patel, R. C., and G. C. Sen. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Embo J* 17: 4379-90.
- Pauley, K. M., T. Eystathioy, A. Jakymiw, J. C. Hamel, M. J. Fritzler, and E. K. Chan. 2006. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep* 7: 904-10.
- Pelham, H. R. 1982. A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 30: 517-28.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux, and G. Dreyfuss. 1998. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95: 615-24.
- Petrakis, S., and T. Sklaviadis. 2006. Identification of proteins with high affinity for refolded and native PrPC. *Proteomics* 6: 6476-84.
- Piccardo, P., B. Ghetti, D. W. Dickson, H. V. Vinters, G. Giaccone, O. Bugiani, F. Tagliavini, K. Young, S. R. Dlouhy, C. Seiler, and et al. 1995. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (PRNP P102L): amyloid deposits are best recognized by antibodies directed to epitopes in PrP region 90-165. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 790-801.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309: 1573-6.
- Poulter, M., H. F. Baker, C. D. Frith, M. Leach, R. Lofthouse, R. M. Ridley, T. Shah, F. Owen, J. Collinge, J. Brown, and et al. 1992. Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. *Brain* 115 (Pt 3): 675-85.
- Prestori, F., P. Rossi, B. Bearzatto, J. Laine, D. Necchi, S. Diwakar, S. N. Schiffmann, H. Axelrad, and E. D'Angelo. 2008. Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knock-out mice with impaired motor control. *J Neurosci* 28: 7091-103.
- Price, N. T., and C. G. Proud. 1990. Phosphorylation of protein synthesis initiation factor-2. Identification of the site in the alpha-subunit phosphorylated in reticulocyte lysates. *Biochim Biophys Acta* 1054: 83-8.
- Proske, D., S. Gilch, F. Wopfner, H. M. Schatzl, E. L. Winnacker, and M. Famulok. 2002. Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *Chembiochem* 3: 717-25.
- Prusiner, S. B. 1989. Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol* 43: 345-74.
- Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. Burton, S. L. Yang, and S. J. DeArmond. 1993. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10608-12.
- Prusiner, S. B., and M. R. Scott. 1997. Genetics of prions. *Annu Rev Genet* 31: 139-75.
- Puckett, C., P. Concannon, C. Casey, and L. Hood. 1991. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49: 320-9.

- Pushie, M. J., and H. J. Vogel. 2008. Modeling by Assembly and Molecular Dynamics Simulations of the Low Cu²⁺ Occupancy Form of the Mammalian Prion Protein Octarepeat Region: Gaining Insight into Cu²⁺-Mediated {beta}-cleavage. *Biophys J*.
- Rachidi, W., A. Mange, A. Senator, P. Guiraud, J. Riondel, M. Benboubetra, A. Favier, and S. Lehmann. 2003. Prion infection impairs copper binding of cultured cells. *J Biol Chem* 278: 14595-8.
- Rachidi, W., J. Riondel, H. M. McMahon, and A. Favier. 2005. [Prion protein and copper: a mysterious relationship]. *Pathol Biol (Paris)* 53: 244-50.
- Rajendran, K. S., and P. D. Nagy. 2003. Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *J Virol* 77: 9244-58.
- Rambold, A. S., M. Miesbauer, D. Rapaport, T. Bartke, M. Baier, K. F. Winklhofer, and J. Tatzelt. 2006. Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17: 3356-68.
- Rana, T. M. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 23-36.
- Rane, N. S., S. W. Kang, O. Chakrabarti, L. Feigenbaum, and R. S. Hegde. 2008. Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell* 15: 359-70.
- Rane, N. S., J. L. Yonkovich, and R. S. Hegde. 2004. Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *Embo J* 23: 4550-9.
- Ravikumar, B., R. Duden, and D. C. Rubinsztein. 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11: 1107-17.
- Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J. E. Davies, S. Luo, L. G. Oroz, F. Scaravilli, D. F. Easton, R. Duden, C. J. O'Kane, and D. C. Rubinsztein. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36: 585-95.
- Redecke, L., M. von Bergen, J. Clos, P. V. Konarev, D. I. Svergun, U. E. Fittschen, J. A. Broekaert, O. Bruns, D. Georgieva, E. Mandelkow, N. Genov, and C. Betzel. 2007. Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro. *J Struct Biol* 157: 308-20.
- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, D. Gatfield, and E. Izaurralde. 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 11: 1640-7.
- Rhie, A., L. Kirby, N. Sayer, R. Wellesley, P. Disterer, I. Sylvester, A. Gill, J. Hope, W. James, and A. Tahiri-Alaoui. 2003. Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem* 278: 39697-705.
- Richardson, E. P., Jr., and C. L. Masters. 1995. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol* 5: 33-41.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382: 180-2.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413: 282-8.
- Riesner, D., K. Kellings, U. Wiese, M. Wulfert, C. Mirenda, and S. B. Prusiner. 1993. Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand* 80: 173-81.

- Robakis, N. K., E. A. Devine-Gage, E. C. Jenkins, R. J. Kascsak, W. T. Brown, M. S. Krawczun, and W. P. Silverman. 1986a. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 140: 758-65.
- Robakis, N. K., P. R. Sawh, G. C. Wolfe, R. Rubenstein, R. I. Carp, and M. A. Innis. 1986b. Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6377-81.
- Robertson, C., S. A. Booth, D. R. Beniac, M. B. Coulthart, T. F. Booth, and A. McNicol. 2006. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 107: 3907-11.
- Robertson, J., M. M. Doroudchi, M. D. Nguyen, H. D. Durham, M. J. Strong, G. Shaw, J. P. Julien, and W. E. Mushynski. 2003. A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. *J Cell Biol* 160: 939-49.
- Roesler, R., R. Walz, J. Quevedo, F. de-Paris, S. M. Zanata, E. Graner, I. Izquierdo, V. R. Martins, and R. R. Brentani. 1999. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* 71: 349-53.
- Rossi, D., A. Cozzio, E. Flechsig, M. A. Klein, T. Rulicke, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 2001. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo J* 20: 694-702.
- Roucou, X., Q. Guo, Y. Zhang, C. G. Goodyer, and A. C. LeBlanc. 2003. Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* 278: 40877-81.
- Rouelle-Rossier, V. B., M. Biggiogera, and S. Fakan. 1993. Ultrastructural detection of calcium and magnesium in the chromatoid body of mouse spermatids by electron spectroscopic imaging and electron energy loss spectroscopy. *J Histochem Cytochem* 41: 1155-62.
- Rudd, P. M., T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S. F. Wheeler, D. J. Harvey, M. R. Wormald, H. Serban, S. B. Prusiner, A. Kobata, and R. A. Dwek. 1999. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13044-9.
- Russell, L., and B. Frank. 1978. Ultrastructural characterization of nuage in spermatocytes of the rat testis. *Anat Rec* 190: 79-97.
- Safar, J. G., K. Kellings, A. Serban, D. Groth, J. E. Cleaver, S. B. Prusiner, and D. Riesner. 2005. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79: 10796-806.
- Saffman, E. E., and P. Lasko. 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55: 1141-63.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, and T. Noda. 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-31.
- Sakudo, A., D. C. Lee, S. Li, T. Nakamura, Y. Matsumoto, K. Saeki, S. Itohara, K. Ikuta, and T. Onodera. 2005a. PrP cooperates with STII to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 14-9.
- Sakudo, A., D. C. Lee, T. Nishimura, S. Li, S. Tsuji, T. Nakamura, Y. Matsumoto, K. Saeki, S. Itohara, K. Ikuta, and T. Onodera. 2005b. Octapeptide repeat region and N-terminal half of hydrophobic region of prion protein (PrP) mediate PrP-dependent activation of superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 600-6.

- Sakudo, A., T. Onodera, Y. Suganuma, T. Kobayashi, K. Saeki, and K. Ikuta. 2006. Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6: 589-601.
- Sakurai-Yamashita, Y., S. Sakaguchi, D. Yoshikawa, N. Okimura, Y. Masuda, S. Katamine, and M. Niwa. 2005. Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein. *Neuroscience* 136: 281-7.
- Sanchez-Carbente Mdel, R., and L. Desgroseillers. 2008. Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169: 41-58.
- Sato, K., T. Sugita, K. Kobayashi, K. Fujita, T. Fujii, Y. Matsumoto, T. Mikami, N. Nishizuka, S. Nishizuka, K. Shojima, M. Suda, G. Takahashi, H. Himeno, A. Muto, and S. Ishida. 2001. Localization of mitochondrial ribosomal RNA on the chromatoid bodies of marine planarian polyclad embryos. *Dev Growth Differ* 43: 107-14.
- Satoh, J., Y. Kuroda, and S. Katamine. 2000. Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am J Pathol* 157: 59-68.
- Satoh, J., S. Obayashi, T. Misawa, K. Sumiyoshi, K. Oosumi, and H. Tabunoki. 2008. Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol*.
- Saunders, P. T., M. R. Millar, S. M. Maguire, and R. M. Sharpe. 1992. Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Mol Reprod Dev* 33: 385-91.
- Savvateeva-Popova, E., A. Popov, A. Grossman, E. Nikitina, A. Medvedeva, A. Peresleni, L. Korochkin, J. G. Moe, E. Davidowitz, K. Pyatkov, E. Myasnyankina, O. Zatspeina, N. Schostak, E. Zelentsova, and M. Evgen'ev. 2007. Pathogenic chaperone-like RNA induces congophilic aggregates and facilitates neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell Stress Chaperones* 12: 9-19.
- Sayer, N. M., M. Cubin, A. Rhie, M. Bullock, A. Tahiri-Alaoui, and W. James. 2004. Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers. *J Biol Chem* 279: 13102-9.
- Schickel, R., B. Boyerinas, S. M. Park, and M. E. Peter. 2008. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 27: 5959-74.
- Sekiya, S., F. Nishikawa, K. Noda, P. K. Kumar, T. Yokoyama, and S. Nishikawa. 2005. In vitro selection of RNA aptamers against cellular and abnormal isoform of mouse prion protein. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 361-2.
- Sen, G. L., and H. M. Blau. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-6.
- . 2006. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *Faseb J* 20: 1293-9.
- Sheth, U., and R. Parker. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-8.
- . 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125: 1095-109.
- Shibata, N., N. Tsunekawa, S. Okamoto-Ito, R. Akasu, A. Tokumasu, and T. Noce. 2004. Mouse RanBPM is a partner gene to a germline specific RNA helicase, mouse vasa homolog protein. *Mol Reprod Dev* 67: 1-7.
- Shibata, N., Y. Umesono, H. Orii, T. Sakurai, K. Watanabe, and K. Agata. 1999. Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev Biol* 206: 73-87.

- Shyu, W. C., H. J. Harn, K. Saeki, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, T. Onodera, C. J. Chen, Y. D. Hsu, and Y. H. Chiang. 2002. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol Neurobiol* 26: 1-12.
- Shyu, W. C., M. C. Kao, W. Y. Chou, Y. D. Hsu, and B. W. Soong. 2000. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport* 11: 771-4.
- Shyu, W. C., S. Z. Lin, K. Saeki, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, T. Onodera, M. F. Chiang, P. Thajeb, and H. Li. 2004. Hyperbaric oxygen enhances the expression of prion protein and heat shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 24: 257-68.
- Silva, J. L., L. M. Lima, D. Foguel, and Y. Cordeiro. 2008. Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* 33: 132-40.
- Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes, and B. Caughey. 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* 437: 257-61.
- Silverman, G. L., K. Qin, R. C. Moore, Y. Yang, P. Mastrangelo, P. Tremblay, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, and D. Westaway. 2000. Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* 275: 26834-41.
- Simoneau, S., H. Rezaei, N. Sales, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque, C. Vidal, J. G. Fournier, J. Comte, F. Wopfner, J. Grosclaude, H. Schatzl, and C. I. Lasmezas. 2007. In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog* 3: e125.
- Soderstrom, K. O. 1978. Formation of chromatoid body during rat spermatogenesis. *Z Mikrosk Anat Forsch* 92: 417-30.
- Soderstrom, K. O., and M. Parvinen. 1976. Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell Tissue Res* 168: 335-42.
- Solfrosi, L., A. Bellon, M. Schaller, J. T. Cruite, G. C. Abalos, and R. A. Williamson. 2007. Toward molecular dissection of PrPC-PrPSc interactions. *J Biol Chem* 282: 7465-71.
- Sparkes, R. S., M. Simon, V. H. Cohn, R. E. Fournier, J. Lem, I. Klisak, C. Heinzmann, C. Blatt, M. Lucero, T. Mohandas, and et al. 1986. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7358-62.
- Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C. L. Bassetti, and D. M. Hermann. 2005. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* 20: 442-9.
- St George-Hyslop, P., and C. Haass. 2008. Regulatory RNA goes awry in Alzheimer's disease. *Nat Med* 14: 711-2.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao, and S. B. Prusiner. 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-40.
- Steele, A. D., J. G. Emsley, P. H. Ozdinler, S. Lindquist, and J. D. Macklis. 2006. Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3416-21.
- Steward, O., and P. Worley. 2002. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem* 78: 508-27.
- Stewart, R. S., B. Drisaldi, and D. A. Harris. 2001. A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* 12: 881-9.

- Stewart, R. S., and D. A. Harris. 2003. Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *J Biol Chem* 278: 45960-8.
- Stimson, E., J. Hope, A. Chong, and A. L. Burlingame. 1999. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38: 4885-95.
- Stockel, J., J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner. 1998. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37: 7185-93.
- Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze, and G. Raposo. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3: 321-30.
- Strom, A., S. Diecke, G. Hunsmann, and A. W. Stuke. 2006. Identification of prion protein binding proteins by combined use of far-Western immunoblotting, two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 6: 26-34.
- Strom, A., G. S. Wang, R. Reimer, D. T. Finegood, and F. W. Scott. 2007. Pronounced cytosolic aggregation of cellular prion protein in pancreatic beta-cells in response to hyperglycemia. *Lab Invest* 87: 139-49.
- Styhler, S., A. Nakamura, A. Swan, B. Suter, and P. Lasko. 1998. vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* 125: 1569-78.
- Sunyach, C., A. Jen, J. Deng, K. T. Fitzgerald, Y. Frobert, J. Grassi, M. W. McCaffrey, and R. Morris. 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* 22: 3591-601.
- Szebenyi, G., W. C. Wigley, B. Hall, A. Didier, M. Yu, P. Thomas, and H. Kramer. 2007. Hook2 contributes to aggresome formation. *BMC Cell Biol* 8: 19.
- Takemura, K., P. Wang, I. Vorberg, W. Surewicz, S. A. Priola, A. Kanthasamy, R. Pottathil, S. G. Chen, and S. Sreevatsan. 2006. DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 204-14.
- Tanaka, M., Y. M. Kim, G. Lee, E. Junn, T. Iwatsubo, and M. M. Mouradian. 2004. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* 279: 4625-31.
- Tanaka, S. S., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama, and T. Noce. 2000. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14: 841-53.
- Tatzelt, J., J. Zuo, R. Voellmy, M. Scott, U. Hartl, S. B. Prusiner, and W. J. Welch. 1995. Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2944-8.
- Tay, Y., J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim, and I. Rigoutsos. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*.
- Taylor, J. P., F. Tanaka, J. Robitschek, C. M. Sandoval, A. Taye, S. Markovic-Plese, and K. H. Fischbeck. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* 12: 749-57.
- Teixeira, D., U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, and R. Parker. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* 11: 371-82.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90.

- Thackray, A. M., and R. Bujdoso. 2002. PrP(c) expression influences the establishment of herpes simplex virus type 1 latency. *J Virol* 76: 2498-509.
- . 2006. Elevated PrPC expression predisposes to increased HSV-1 pathogenicity. *Antivir Chem Chemother* 17: 41-52.
- Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2: 569-79.
- Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio. 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16: 405-20.
- Tian, Q., M. Streuli, H. Saito, S. F. Schlossman, and P. Anderson. 1991. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67: 629-39.
- Tobler, I., T. Deboer, and M. Fischer. 1997. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* 17: 1869-79.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, and J. C. Manson. 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-42.
- Toppari, J., and M. Parvinen. 1985. In vitro differentiation of rat seminiferous tubular segments from defined stages of the epithelial cycle morphologic and immunolocalization analysis. *J Androl* 6: 334-43.
- Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard, E. Bertrand, and J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160: 823-31.
- Towle, H. C. 2007. The metabolic sensor GCN2 branches out. *Cell Metab* 5: 85-7.
- Toyooka, Y., N. Tsunekawa, Y. Takahashi, Y. Matsui, M. Satoh, and T. Noce. 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* 93: 139-49.
- Unterholzner, L., and E. Izaurralde. 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 16: 587-96.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, G. J. Hannon, and R. Parker. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20: 515-24.
- Valenti, P., A. Cozzio, N. Nishida, D. P. Wolfner, S. Sakaguchi, and H. P. Lipp. 2001. Similar target, different effects: late-onset ataxia and spatial learning in prion protein-deficient mouse lines. *Neurogenetics* 3: 173-84.
- van Dijk, E., N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle, and B. Seraphin. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J* 21: 6915-24.
- Vassallo, N., J. Herms, C. Behrens, B. Krebs, K. Saeki, T. Onodera, O. Windl, and H. A. Kretschmar. 2005. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 75-82.
- Vella, L. J., R. A. Sharples, V. A. Lawson, C. L. Masters, R. Cappai, and A. F. Hill. 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211: 582-90.
- Ventela, S., J. Toppari, and M. Parvinen. 2003. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol Biol Cell* 14: 2768-80.
- Vilette, D., O. Andreatti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann, and H. Laude. 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4055-9.

- Vincent, B. 2004. ADAM proteases: protective role in Alzheimer's and prion diseases? *Curr Alzheimer Res* 1: 165-74.
- Vincent, B., M. A. Cisse, C. Sunyach, M. V. Guillot-Sestier, and F. Checler. 2008. Regulation of betaAPP and PrPc cleavage by alpha-secretase: mechanistic and therapeutic perspectives. *Curr Alzheimer Res* 5: 202-11.
- Vnencak-Jones, C. L., and J. A. Phillips, 3rd. 1992. Identification of heterogeneous PrP gene deletions in controls by detection of allele-specific heteroduplexes (DASH). *Am J Hum Genet* 50: 871-2.
- Wadsworth, J. D., A. F. Hill, J. A. Beck, and J. Collinge. 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 66: 241-54.
- Waelter, S., A. Boeddrich, R. Lurz, E. Scherzinger, G. Lueder, H. Lehrach, and E. E. Wanker. 2001. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12: 1393-407.
- Walt, H., and B. L. Armbruster. 1984. Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res* 236: 487-90.
- Wang, E. 2007. MicroRNA, the putative molecular control for mid-life decline. *Ageing Res Rev* 6: 1-11.
- Wang, G., J. M. van der Walt, G. Mayhew, Y. J. Li, S. Zuchner, W. K. Scott, E. R. Martin, and J. M. Vance. 2008a. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 82: 283-9.
- Wang, V., T. C. Chuang, Y. D. Hsu, W. Y. Chou, and M. C. Kao. 2005a. Nitric oxide induces prion protein via MEK and p38 MAPK signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 95-100.
- Wang, W. X., B. W. Rajeev, A. J. Stromberg, N. Ren, G. Tang, Q. Huang, I. Rigoutsos, and P. T. Nelson. 2008b. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 28: 1213-23.
- Wang, X., F. Wang, M. S. Sy, and J. Ma. 2005b. Calpain and other cytosolic proteases can contribute to the degradation of retro-translocated prion protein in the cytosol. *J Biol Chem* 280: 317-25.
- Warner, R. G., C. Hundt, S. Weiss, and J. E. Turnbull. 2002. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 18421-30.
- Watarai, M., S. Kim, J. Erdenebaatar, S. Makino, M. Horiuchi, T. Shirahata, S. Sakaguchi, and S. Katamine. 2003. Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med* 198: 5-17.
- Watt, N. T., and N. M. Hooper. 2005. Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 33: 1123-5.
- Watt, N. T., D. R. Taylor, A. Gillott, D. A. Thomas, W. S. Perera, and N. M. Hooper. 2005. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280: 35914-21.
- Wechselberger, C., S. Wurm, W. Pfarr, and O. Hoglinger. 2002. The physiological functions of prion protein. *Exp Cell Res* 281: 1-8.
- Weise, J., O. Crome, R. Sandau, W. Schulz-Schaeffer, M. Bahr, and I. Zerr. 2004. Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett* 372: 146-50.
- Weise, J., R. Sandau, S. Schwarting, O. Crome, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, and M. Bahr. 2006. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation,

- enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37: 1296-300.
- Weiss, S., D. Proske, M. Neumann, M. H. Groschup, H. A. Kretzschmar, M. Famulok, and E. L. Winnacker. 1997. RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* 71: 8790-7.
- Weissmann, C., and E. Flechsig. 2003. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66: 43-60.
- White-Grindley, E., and K. Si. 2006. RISC-y Memories. *Cell* 124: 23-6.
- White, A. R., S. J. Collins, F. Maher, M. F. Jobling, L. R. Stewart, J. M. Thyer, K. Beyreuther, C. L. Masters, and R. Cappai. 1999. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol* 155: 1723-30.
- Whittington, M. A., K. C. Sidle, I. Gowland, J. Meads, A. F. Hill, M. S. Palmer, J. G. Jefferys, and J. Collinge. 1995. Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* 9: 197-201.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry, and D. Weil. 2005. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* 118: 981-92.
- Wileman, T. 2007. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu Rev Microbiol* 61: 149-67.
- Williams, A. E., M. M. Perry, S. A. Moschos, and M. A. Lindsay. 2007. microRNA expression in the aging mouse lung. *BMC Genomics* 8: 172.
- Windl, O., M. Dempster, J. P. Estibeiro, R. Lathe, R. de Silva, T. Esmonde, R. Will, A. Springbett, T. A. Campbell, K. C. Sidle, M. S. Palmer, and J. Collinge. 1996. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* 98: 259-64.
- Windl, O., A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, K. Skworc, S. Arendt, C. Oberdieck, M. Bodemer, S. Poser, and H. A. Kretzschmar. 1999. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 105: 244-52.
- Wong, B. S., T. Liu, R. Li, T. Pan, R. B. Petersen, M. A. Smith, P. Gambetti, G. Perry, J. C. Manson, D. R. Brown, and M. S. Sy. 2001. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* 76: 565-72.
- Wong, E. S., J. M. Tan, W. E. Soong, K. Hussein, N. Nukina, V. L. Dawson, T. M. Dawson, A. M. Cuervo, and K. L. Lim. 2008. Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Hum Mol Genet* 17: 2570-82.
- Wu, S., and R. J. Kaufman. 1997. A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J Biol Chem* 272: 1291-6.
- Yamaguchi, N., S. Sakaguchi, K. Shigematsu, N. Okimura, and S. Katamine. 2004. Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1247-52.
- Yamashita, A., T. C. Chang, Y. Yamashita, W. Zhu, Z. Zhong, C. Y. Chen, and A. B. Shyu. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12: 1054-63.
- Yang, Z., A. Jakymiw, M. R. Wood, T. Eystathioy, R. L. Rubin, M. J. Fritzler, and E. K. Chan. 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* 117: 5567-78.

- Yedidia, Y., L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, and A. Taraboulos. 2001. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J* 20: 5383-91.
- Yekta, S., I. H. Shih, and D. P. Bartel. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304: 594-6.
- Yoshida-Kashikawa, M., N. Shibata, K. Takechi, and K. Agata. 2007. DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Dev Dyn* 236: 3436-50.
- Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 145-50.
- Zanusso, G., R. B. Petersen, T. Jin, Y. Jing, R. Kanoush, S. Ferrari, P. Gambetti, and N. Singh. 1999. Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem* 274: 23396-404.
- Zhang, C. C., A. D. Steele, S. Lindquist, and H. F. Lodish. 2006. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2184-9.
- Zhang, P., B. C. McGrath, J. Reinert, D. S. Olsen, L. Lei, S. Gill, S. A. Wek, K. M. Vattam, R. C. Wek, S. R. Kimball, L. S. Jefferson, and D. R. Cavener. 2002. The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol* 22: 6681-8.
- Zheng, D., N. Ezzeddine, C. Y. Chen, W. Zhu, X. He, and A. B. Shyu. 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* 182: 89-101.