

Université de Sherbrooke

**Caractérisation du rôle de la protéine prion cellulaire et de ses formes pathologiques  
dans la régulation des ARNm et de la réponse au stress cellulaire.**

Par Simon Beaudoin

Programme de biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de  
l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Biochimie

**Sherbrooke, Québec, Canada**

**Août 2013**

Membres du jury d'évaluation :

Dr. Xavier Roucou, directeur de recherche (FMSS, Département de biochimie, UdeS)

Dr. Martin Bisailon (FMSS, Département de biochimie, UdeS)

Dr. Christine Lavoie (FMSS, Département de pharmacologie, UdeS)

Dr. Rachid Mazroui (FMSS, Département de biologie moléculaire, biochimie médicale et  
pathologique, université Laval)

© Simon Beaudoin, 2013



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: 978-0-499-00440-6*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-499-00440-6*

#### 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.

#### 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.

---

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.

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

## **DÉDICACE**

Je dédie ma thèse à mes parents, Lucille et Richard Beaudoin, qui m'ont toujours supporté dans mes études et à mon grand-père, Jacques Massé, qui m'a légué sa passion et sa curiosité pour les sciences. Je voudrais également dire un merci particulier à ma femme et à ma fille qui m'ont toujours supporté, encouragé et enduré lors de mes études universitaires.

## RÉSUMÉ

### **Caractérisation du rôle de la protéine prion cellulaire et de ses formes pathologiques dans la régulation du système d'ARN interférent et de la réponse au stress cellulaire.**

Par Simon Beaudoin

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en vue l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Biochimie

Certaines maladies neurodégénératives sont associées au mauvais repliement de la protéine prion (PrP<sup>C</sup>) et sont connues sous le nom de maladies à prion ou les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs). Récemment, il a été démontré que PrP<sup>C</sup> augmente l'efficacité des micro-ARN (miARN) via son interaction directe avec la protéine Argonaute 2 (Ago2) au niveau de la membrane des corps multivésiculaires (*multivesicular bodies* (MVBs)). Ago2 est une des protéines centrales du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui est responsable de l'efficacité des ARNi. Certaines formes pathologiques de PrP<sup>C</sup> induisent l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante, une étape déterminante pour le développement de la pathologie. Cependant, l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante favorise normalement la survie cellulaire via la formation de deux types de granules d'ARN, les granules de stress (GSs) et les P-Bodies. Aucune étude n'a investigué le rôle de ces deux types de granules d'ARN et de la régulation de l'efficacité des miARN par PrP<sup>C</sup> dans la neurotoxicité associée aux ESTs.

Mon premier objectif est d'approfondir nos connaissances sur le nouveau rôle de PrP<sup>C</sup> dans la régulation du système miARN et de l'implication des miARN et du système endosomal dans les ESTs génétiques. Mon second objectif est d'investiguer le rôle des GSs et des P-Bodies, dans la neurotoxicité reliée aux ESTs et établir un lien entre la dérégulation de la réponse au stress et du système ARNi.

PrP<sup>C</sup> augmente l'efficacité des miARN via l'interaction de sa région octapeptidique répété (OR, *octapeptide repeat region*) avec la protéine Ago2. L'effet d'un mutant cytoplasmique artificiel nommé CyPrP (connu comme agent neurotoxique potentiel) et de cinq mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> sur le système endosomal et miARN a été caractérisé. Les mutants de PrP<sup>C</sup> affectent la maturation des MVBs et, conséquemment, induisent une délocalisation de GW182, une diminution l'efficacité des miARN et de la production des exosomes. Nous proposons que cette dérégulation de la voie endosomale et miARN par les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> contribue à la neurodégénérescence observée dans les ESTs.

Les mutants de PrP<sup>C</sup> induisent également l'expression de la protéine PACT qui est responsable de l'activation de la kinase de stress PKR et de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Cependant, malgré la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> inhibent la formation des GSs et des P-Bodies augmentant la susceptibilité des cellules aux différents stress. L'inhibition des P-bodies par les mutants confirment également que les mutants de PrP<sup>C</sup> induisent une diminution de l'efficacité des miARN. Je propose que le maintien de l'activation de la voie PACT-PKR-eIF2 $\alpha$  et l'inhibition des GSs et des P-Bodies contribuent à la dérégulation du système d'ARNi, à la susceptibilité des neurones et à la neurodégénérescence observée dans les ESTs. Une meilleure compréhension des mécanismes de neurotoxicité plus particulièrement de l'inhibition du système ARNi et de la réponse au stress par les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> peut mener au développement de médicaments afin de contrer l'évolution de la pathologie.

**Mots clés : prion, encéphalopathie spongiforme transmissible, micro-ARN, granules de stress, P-Bodies, neurotoxicité, réponse au stress, corps multivésiculaires**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>DÉDICACE</b> .....	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLES DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1. La protéine prion cellulaire.....	1
1.1. Caractérisation du gène PRNP.....	1
1.2. Caractérisation de PrP <sup>C</sup> .....	3
1.2.1. Généralités sur PrP <sup>C</sup> .....	3
1.2.2. PrP <sup>C</sup> et le système endolysosomal.....	5
1.2.3. Rôles de PrP <sup>C</sup> .....	9
1.2.3.1. Phénotypes et dérèglements attribués aux souris knockout PRNP.....	9
1.2.3.2. Fonction neuroprotectrice.....	10
1.2.3.2.1. Évidence <i>in vivo</i> du rôle neuroprotecteur de PrP <sup>C</sup> .....	10
1.2.3.2.2. Rôle anti-apoptotique.....	11
1.2.3.2.3. Homéostasie du zinc (Zn <sup>2+</sup> ).....	12
1.2.3.3. Homéostasie des métaux (Cu <sup>2+</sup> et Fe <sup>2+</sup> ) et le stress oxydatif.....	12
1.2.3.3.1. Homéostasie du Cu <sup>2+</sup> .....	12
1.2.3.3.2. Homéostasie du Fe <sup>2+</sup> .....	14
1.2.3.3.3. Stress oxydatif.....	15
1.2.3.4. Partenaires protéiques et les voies signalétiques.....	16
2. Les maladies à prion.....	18
2.1. Les ESTs humaines.....	18
2.2. La protéine prion infectieuse <i>scrapie</i> , PrP <sup>Sc</sup> .....	22
2.3. Mécanisme de neurotoxicité.....	24
2.3.1. Perte et subversion des fonctions physiologiques de PrP <sup>C</sup> .....	25
2.3.2. Gain fonctionnel des espèces toxiques de PrP <sup>C</sup> .....	28
2.3.2.1. Perturbation de l'intégrité des membranes lipidiques.....	28
2.3.2.2. Le stress au RE.....	30
2.3.2.3. La réponse au stress eIF2 $\alpha$ dépendante.....	31
2.3.2.4. Altération de la voie endolysosomale.....	33

3. La régulation des ARNm par le système d'ARN interférent.....	34
3.1. Description du système d'ARN interférent.....	34
3.2. Biogénèse des ARN interférents.....	37
3.2.1. Voie canonique de biogénèse.....	39
3.2.2. Voies non classiques de biogénèse.....	43
3.3. Formation du RISC .....	45
3.4. Localisation du RISC.....	46
3.4.1. Association du RISC avec la membrane du RE .....	46
3.4.2. Association du RISC avec le système endolysosomal .....	47
3.4.3. Association du RISC avec les P-Bodies.....	49
3.5. PrP <sup>C</sup> et le système d'ARNi.....	50
4. La réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$ dépendante.....	51
4.1. Bref aperçu de la réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$ dépendante.....	51
4.2. Les granules de stress.....	54
4.2.1. Formation des granules de stress .....	54
4.2.2. Rôles des granules de stress .....	55
5. Implication de PrP <sup>C</sup> dans le cancer.....	58
6. Similitudes entre les ESTs et les autres maladies neurodégénératives.....	59
6.1. Propagation moléculaire et cellulaire des pathologies.....	59
6.2. Implication possible de PrP <sup>C</sup> dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer.....	59
6.3. Altération du système endolysosomal et miARN.....	60
6.4. Implication de la réponse au stress dans les maladies neurodégénératives.....	61
7. Hypothèses et objectifs de recherche.....	63
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>64</b>
Article 1 soumis dans RNA: <b>PRION PROTEIN FAMILIAL MUTANTS INTERFERE WITH MULTIVESICULAR BODIES MATURATION AND miRNA-RELATED ACTIVITY.....</b>	<b>64</b>
Chapitre 2 : Article en rédaction: <b>LES FORMES MAL REPLIÉES DE PrP<sup>C</sup> INHIBENT LA FORMATION DE DEUX TYPES DE GRANULES D'ARN, LES GRANULES DE STRESS ET LES P-BODIES, CE QUI AUGMENTE LA SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES AUX STRESS CELLULAIRE.....</b>	<b>98</b>
Matériel et méthodes.....	101
Résultats.....	105
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>121</b>

<b>CONCLUSIONS</b> .....	138
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	139
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	140
<b>ANNEXES</b> .....	196

Lettre d'approbation des co-auteurs

Article 1 format original

Article 2 (chapitre 2) en rédaction format original



**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Schématisation du gène PRNP humain.....	2
Figure 2 : Structure secondaire et tertiaire de PrP <sup>C</sup> .....	5
Figure 3 : Maturation des MVBs par les ESCRT.....	8
Figure 4 : PrP <sup>C</sup> et les mutants artificiels de délétion de PrP <sup>C</sup> induisant une neurodégénérescence.....	11
Figure 5 : Principales voies d'activation dépendantes de l'interaction de PrP <sup>C</sup> avec ses partenaires.....	16
Figure 6 : Mutations associées à PrP <sup>C</sup> .....	21
Figure 7 : Conversion PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> et propagation de PrP <sup>Sc</sup> .....	23
Figure 8 : Modèle des trois mécanismes possibles de neurotoxicité des ESTs.....	25
Figure 9 : La réponse au stress eIF2 $\alpha$ dépendante et le mauvais repliement de PrP <sup>C</sup> .....	33
Figure 10 : Résumé du système d'ARNi.....	36
Figure 11 : Modèle de la voie canonique de la maturation des miARN.....	38
Figure 12 : Maturation des pri-miARN en pré-miARN par le complexe Drosha/DGCR8.....	40
Figure 13 : Rôle des différents domaines de Dicer dans la maturation des pré-miARN en miARN.....	41
Figure 14 : Rôle de PACT et TRBP dans la reconnaissance de substrat et la formation du RLC.....	42
Figure 15 : Modèle des voies canoniques et non canoniques de la maturation des miARN.....	44
Figure 16 : Modèle de l'organisation spatiale de la formation du RISC.....	47
Figure 17 : Rôle du système endolysosomal dans l'activité des ARNi.....	48
Figure 18 : Motif GWG au sein du OR de PrP <sup>C</sup> .....	51
Figure 19 : La réponse au stress eIF2 $\alpha$ dépendante.....	53
Figure 20 : Dynamisme entre GSs, P-Bodies et polysomes.....	56

Résultat article 1, Figure 1 : PrP <sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of miRISC, Ago2 and GW182 proteins, in MVB organites of N2a cells.....	77
Résultat article 1, Figure S1 : PrP <sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of RISC, Ago2 and GW182 proteins, in MVB organites of HEK293 cells.....	78
Résultat article 1, Figure 2 : Efficient miRNA activity depends on the OR of PrP <sup>C</sup> .....	80
Résultat article 1, Figure S2: siRNA and shRNA treatment against PrP <sup>C</sup> decrease let-7a miRNA activity.....	81
Résultat article 1, Figure S3: Efficient miRNA activity is dependent on the OR of PrP <sup>C</sup> in Hela cells.....	82
Résultat article 1, Figure 3 : PrP <sup>C</sup> familial mutants and CyPrP, an artificial mutant, inhibit miRNA activity.....	84
Résultat article 1, Figure S4: Familial PrP <sup>C</sup> mutants decrease let-7a miRNA activity in Hela cells.....	85
Résultat article 1, Figure 4 : Familial PrP <sup>C</sup> mutants and CyPrP affect MVBs maturation.....	86
Résultat article 1, Figure 5 : Familial PrP <sup>C</sup> mutants and CyPrP alter the localization of GW182.....	87
Résultat article 1, Figure 6 : Familial PrP <sup>C</sup> mutants and CyPrP affect secreted exosomes...89	
Résultat article 2, Figure 1 : Les mutants familiaux de PrP <sup>C</sup> induisent la réponse au stress cellulaire PACT/PKR/eIF2 $\alpha$ dépendante.....	107
Résultat article 2, Figure suppl. 1 : Le domaine C-terminal de CyPrP inhibe la formation des GSs suite à un stress oxydatif.....	109
Résultat article 2, Figure suppl. 1 : Colocalisation entre les ARNm et TIAR aux GSs.....	110
Résultat article 2, Figure 2 : Les mutants familiaux de PrP <sup>C</sup> inhibent la formation des GSs suite à un stress cellulaire indépendamment de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .....	111
Résultat article 2, Figure 3 : Les mutants de PrP <sup>C</sup> interfèrent avec la formation des P-Bodies.....	113
Résultat article 2, Figure 4 : Les mutants de PrP <sup>C</sup> augmentent l'activité siARN.....	114
Résultat article 2, Figure 5 : PrP <sup>C</sup> interagit avec les P-Bodies et stabilise l'association d'Ago2 avec les P-Bodies.....	115
Résultat article 2, Figure 6 : PrP <sup>C</sup> est un régulateur négatif de l'activité siARN.....	117
Résultat article 2, Figure 7 : PrP <sup>Sc</sup> inhibe la formation des GSs et des P-Bodies comme les mutants familiaux de PrP <sup>C</sup> .....	118

Résultat article 2, Figure 8 : CyPrP séquestre des protéines importantes pour les GSs et les P-Bodies.....	120
Figure 21 : Modèle de la fonction de PrP <sup>C</sup> dans l'activité des miARN.....	124
Figure 22 : Modèle de l'altération du système ARNi par les formes mal repliées de PrP <sup>C</sup> .....	128
Figure 23 : Modèle du mécanisme de neurotoxicité impliquant l'inhibition de deux types de granules d'ARN, P-Bodies et GSs, par les formes mal repliées de PrP <sup>C</sup> .....	134

**LISTE DES TABLEAUX**

Table 1 : Classification des ESTs humaines.....19

Résultat article 1, Table S1: Oligonucleotides used to introduce mutations in PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>GFP</sup> .....71

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

Ago : Argonaute

Alix : ALG-2-interacting Protein X

AMPA : zinc-permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

AP-1 : activator protein 1

ARN : acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin

ARNi : ARN interférence

ARNm : ARN messenger

Asn : asparagine

ATM : ataxia-telanfiectasia mutated

ATP : adénosine 5'-triphosphate

ARE : AU-rich element

Bax : Bcl-2-associated X protein

BSE : encéphalopathie spongiforme bovine

CHMP: chromatin-modifying protein/charged multivesicular body protein

CJD : maladie de Creutzfeldt-Jakob

CREB : cAMP-responsive element binding protein

CTR2 : Copper transport protein

$\text{Cu}^{2+}$  : cuivre

CyPrP : PrP cytoplasmique

Cys : cysteine

Dcp1a : decapping enzyme 1a

Dcp2 : decapping enzyme 2

DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region 8

DMT-1 : divalent metal transporter 1

Domaine PAZ : Domaine Piwi-Argonaute-Zwille

DBR1 : debranching enzyme

dsRBZ : domaine de liaison à l'ARNdb

4E-BP1 : eIF4E-binding protein 1

eIF2 $\alpha$  : eukaryotic initiation factor 2 alpha

eIF4a : eukaryotic initiation factor 4a

eIF4E : eukaryotic initiation factor 4E

eIF4F : eukaryotic initiation factor 4F

Esp15: EGFR Protein tyrosine kinase Substrate 15

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2

ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport

ESTs : encéphalopathies spongiformes transmissibles

FAST : Fas-activated serine/threonine kinase

fCJD : CJD familiale

Fe<sup>2+</sup> : fer

FFI : insomnie fatal familiale

G3BP1 : Ras GTPase-activating protein-binding protein 1

GCN2 : glucose control non repressible 2

GDP : Guanosine diphosphate

GluA1 et GluA2 : récepteur glutaminergique A1 et A2

GPI : glycosylphosphatidylinositol

GSS : syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker

GSs : granules de stress

GTP : Guanosine-5'-triphosphate

HD : hydrophobe

Hrs: hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

HRI : heme-regulated inhibitor kinase

Hsp : heat shock protein

JNK : Jun N-terminal kinase

Kb : kilobase

KO : knock-out

KD : knock-down

LBPA : acide lysobisphosphatidique

LIP : pool labile intracellulaire

LRP-1 : low-density lipoprotein receptor-related protein 1

LRRK2 : leucine-rich repeat kinase 2

MAP kinase: Mitogen-activated protein kinases

miARN : micro-ARN

miRISC : miRNA RNA-induced silencing complex

Mirtron : intronic miRNA

MNK-ATPase : Menkes copper ATPase

MTK1 : MAP Three Kinase 1

mTOR : mammalian target of rapamycin

MVBs : multivesicular bodies

MyT-1 : myelin transcription factor

MZF-1 : myeloid zinc finger 1

NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule

NFκB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

p21 : protein 21

p53 : protein 53

PABP : Poly A binding protein

**PACT** : protein activator of PKR

**pb** : paire de bases

**PERK** (PKR-like ER resident kinase)

**PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase

**PKA** : protein kinase A

**PKR** : RNA-dependent protein kinase

**pri-ARNi** : pro-précurseur des ARNi

**PRNP** : gène de PrP<sup>C</sup>

**PrP<sup>C</sup>** : protéine prion cellulaire

**PrP<sup>Ctm</sup>** : PrP transmembranaire avec le domaine C-terminal dans la lumière du RE

**PrP<sup>Sc</sup>** : PrP scrapie OR : octapeptide repeat

**ORF** : cadre de lecture ouvert ou région codante

**RACK1** : receptor for activated C-kinase

**RE** : réticulum endoplasmique

**RhoA** : Ras homolog gene family, member A

**RISC** : RNA-induced silencing complex

**RLC** : RISC loading complex

**RPTP $\alpha$**  : récepteur tyrosine phosphatase  $\alpha$

**RSK2** : Ribosomal S6 kinase 2

**ROCK1** : Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1

**ROS** : espèces d'oxygène réactives

**sCJD** : sporadique CJD

**Ser** : sérine

**siARN** : petit ARN interférent

**Simtron** : Splicing-independent mirtron-like miRNAs

**siRISC** : siRNA RNA-induced silencing complex



SP : signal peptide / peptide signal

Sp1 : Specificity Protein 1

SOD : superoxyde dismutase

STAM: signal transducing adaptor molecule

STI-1 : stress-inducible 1

Tf : transferrine

TfR : récepteur à la transferrine

TIA-1 : T-cell intracellular antigen-1

TIAR : TIA-1 related protein

TNAP : tissu non specific alkaline phosphatase

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor

TRAF2 : TNF- $\alpha$  receptor associated factor 2

tRNA<sup>Met</sup> : ARN de transfert couplé à la méthionine

TSG101 : tumor suppressor growth 1

TRBP : HIV-1 TAR RNA-binding protein

TTP : Tristetraprolin

uPAR : urokinase-type plasminogen activator receptor

USP10 : Ubiquitin specific peptidase 10

5'UTR : extrémité 5' non traduit des ARNm

3'UTR : extrémité 3' non traduit des ARNm

vCJD : maladie de la variante de CJD

Vps : Vacuolar protein sorting

XBP-1 : X-Box protein 1

XPO5 : exportin5

XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1

Zn<sup>2+</sup> : zinc

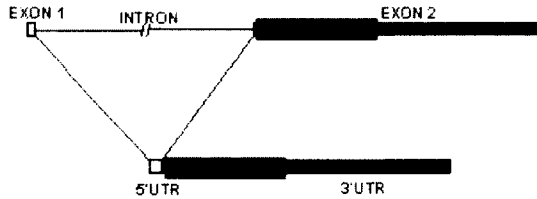
## **INTRODUCTION**

### **1. La protéine prion cellulaire (PrP<sup>C</sup>)**

PrP<sup>C</sup> est impliquée dans diverses maladies neurodégénératives telles que les maladies à prion ou les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) lorsqu'elle adopte une conformation mal repliée. Les mécanismes de neurotoxicité activés dans les ESTs sont encore peu caractérisés. Plusieurs études suggèrent que le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup> initie la pathologie en induisant deux mécanismes généraux de neurotoxicité soit : 1) la perte ou la subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup>; 2) le gain fonctionnel des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>. Jusqu'à ce jour, aucune thérapie ou médicament n'existe pour retarder la maladie. Ceci démontre bien l'importance d'étudier les rôles physiologiques de PrP<sup>C</sup>, leurs implications dans la neurotoxicité associée aux ESTs ainsi que les effets des formes toxiques et mal repliées de PrP<sup>C</sup> sur les divers processus cellulaires associés à la pathologie.

#### **1.1. Caractérisation du gène PRNP**

Le gène PRNP est conservé chez les vertébrés et encode la protéine prion cellulaire (PrP<sup>C</sup>). PRNP est exprimé ubiquitairement dans tout l'organisme (Robakis et al, 1986b) mais majoritairement au niveau des neurones. Chez l'humain, PRNP se situe sur le chromosome 20 et est constitué d'un long intron de 13kb et de deux exons, soit l'exon 1 de 134 pb et l'exon 2 de 2377 pb (Liao et al, 1986, Robakis et al, 1986a, Sparkes et al, 1986) (Figure 1).



**Figure 1: Schématisation du gène PRNP humain**

*PRNP humain est composé d'un long intron de 13kb et de deux exons. L'exon 1 (134 pb) constitue une partie de l'extrémité 5' non traduit des ARNm (5'UTR), alors que l'exon 2 (2377 pb) comprend l'autre partie du 5'UTR, la région codante (ORF) et le 3'UTR.*

Le promoteur du gène PRNP est constitué d'une boîte CCAAT (Mahal et al, 2001) et d'une région riche en GC permettant le recrutement du facteur de transcription Sp1 (Mahal et al, 2001, McKnight & Tjian, 1986, Prusiner & Scott, 1997, Puckett et al, 1991, Shyu et al, 2002). Ce type de promoteur se retrouve dans plusieurs autres gènes constitutivement exprimés (*housekeeping gene*). De plus, la séquence promotrice de PRNP est aussi constituée de deux éléments *Heat Shock* (Shyu et al, 2000, Shyu et al, 2002) et des *Metal Response Element* (Varela-Nallar et al, 2006b) qui permettent respectivement l'induction de son expression lors de stress cellulaire ou en réponse à un changement de l'homéostasie des métaux tels que le cuivre. Une étude récente a démontré que le promoteur de PRNP contient des motifs *endoplasmic reticulum stress element* qui permettent d'induire son expression en condition de stress au réticulum endoplasmique (RE) via l'activation du transactivateur transcriptionnel XBP-1 (X-Box protein 1) (Misiewicz et al, 2013). Des analyses *in silico* ainsi que le séquençage de cette région ont mis en évidence des sites putatifs de liaison pour plusieurs autres facteurs de transcription tels que le facteur de transcription, MZF-1 (*myeloid zinc finger*), AP-1 (*activator protein 1*) et MyT-1 (*myelin transcription factor*) (Taheny et al, 2009, Varela-Nallar et al, 2006b). Ceci démontre bien la complexité de la régulation de la transcription de PRNP *in vivo*. La séquence codante de la protéine humaine est située uniquement sur l'exon 2 qui comporte aussi le 3' non traduit de l'ARNm, tandis l'exon 1 correspond au 5' non traduit de l'ARNm (Basler et al, 1986, Lee et al, 1998, Prusiner & Scott, 1997, Puckett et al, 1991). Des études récentes ont démontré que la séquence codante de l'ARNm de PrP<sup>C</sup> encode

trois protéines via un mécanisme d'initiation alternative (Juanes et al, 2009, Lund et al, 2009, Vanderperre et al, 2011). Les auteurs ont démontré la présence et l'utilisation de deux autres codons d'initiation AUG suivant celui initiant l'expression de PrP<sup>C</sup>. Le premier codon initiateur AUG alternatif permet l'expression d'une forme cytoplasmique de PrP<sup>C</sup> puisque la protéine résultante est PrP<sup>C</sup> ne contenant pas le peptide signal N-terminal empêchant sa translocation au RE (Juanes et al, 2009, Lund et al, 2009). Le deuxième codon initiateur alternatif est situé dans un cadre de lecture différent de PrP<sup>C</sup>, ce qui fait que la séquence primaire de la protéine résultante nommée altPrP est complètement différente de PrP<sup>C</sup>. Cette dernière étude a donc démontré que la séquence codante de l'ARNm de PrP<sup>C</sup> encode deux protéines complètement différentes par initiation alternative, ce qui pourrait expliquer les études controversées et la multitude de fonctions attribuées à PrP<sup>C</sup> (Vanderperre et al, 2011).

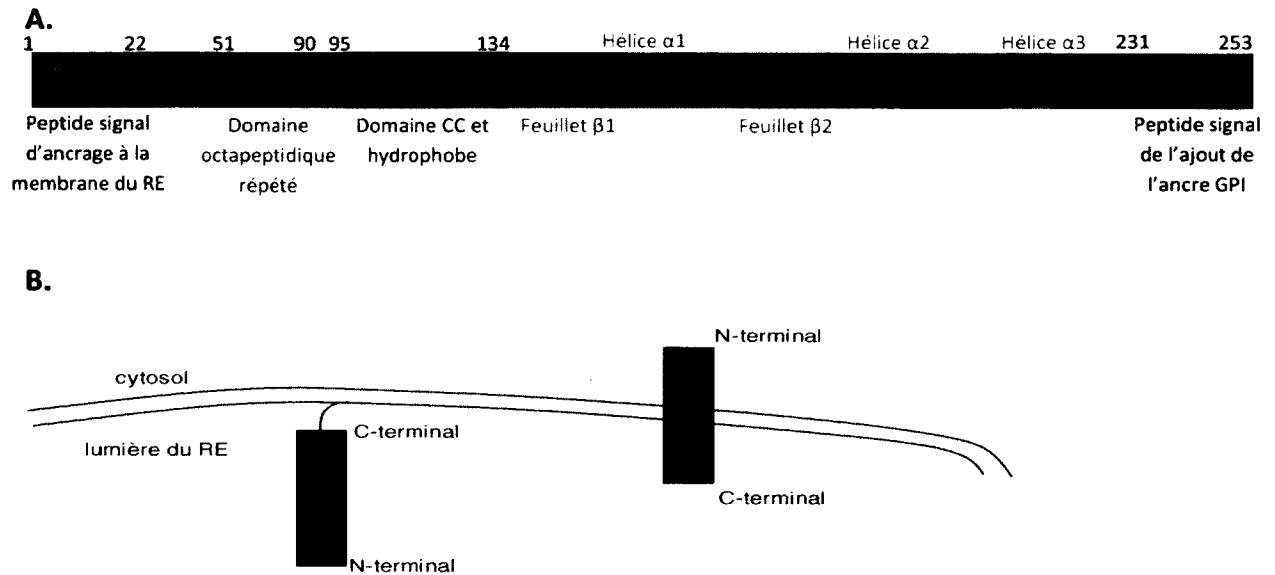
## **1.2. Caractérisation de PrP<sup>C</sup>**

### **1.2.1. Généralités sur PrP<sup>C</sup>**

PRNP humain encode un précurseur de 253 acides aminés comportant deux peptides signaux, un peptide signal en N-terminal favorisant sa translocation au RE et un peptide signal en C-terminal permettant son ancrage à la membrane via l'ajout d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) sur la Ser 230 (Basler et al, 1986, Caughey et al, 1989, Caughey, 1991, Heske et al, 2004, Stahl et al, 1987). Au niveau du RE, PrP<sup>C</sup> subit plusieurs modifications post-traductionnelles dont la formation d'un pont disulfure entre les Cys 179 et 214, l'addition de simple glycosylation au niveau de deux résidus asparagines (Asn) et l'ajout de l'ancre GPI. Suite à l'ajout de l'ancre GPI, les 2 peptides signaux sont clivés pour faire une protéine non mature de 208 acides aminés (23-231) (Figure 2). Au niveau de l'appareil de Golgi, il y a complexification des glycosylations sur les résidus Asn en position 181 et 197 afin de produire une sialoglycoprotéine mature de 34-36 kDa (Endo et al, 1989, Haraguchi et al, 1989, Rudd et al, 1999, Stimson et al, 1999). Les diverses modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour le bon repliement de la

protéine et pour son routage vers la membrane plasmique. Ainsi, PrP<sup>C</sup> est une protéine mature de 207 acides aminés (chez l'humain) se localisant majoritairement à la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques (Caughey et al, 1989, Caughey et al, 1989, Caughey, 1991, Harris, 2003, Lee et al, 1998, Magalhaes et al, 2002, Negro et al, 2001).

La structure secondaire de PrP<sup>C</sup> est caractérisée par un long domaine N-terminal non structuré et un domaine C-terminal structuré contenant trois hélices  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$  (Figure 2) (Donne et al, 1997, Endo et al, 1989, Haraguchi et al, 1989, Rudd et al, 1999, Stimson et al, 1999, Zahn et al, 2000). La séquence primaire du domaine N-terminal de PrP<sup>C</sup> est caractérisée par une répétition de cinq copies d'un octapeptide, P(H/Q)GGG(G)WGQ, située entre les acides aminés 51 et 90 (Figure 2). Cette région est nommée *octapeptide repeat* (OR) et est hautement conservée, ce qui lui suggère un rôle important. PrP<sup>C</sup> contient une deuxième région hautement conservée se localisant dans le milieu de la protéine (a.a. 95-134). Ce domaine est une région chargée suivi d'une séquence hydrophobe importante pour la structure et la topologie de la protéine. Certaines mutations de ce domaine induisent un changement topologique de la protéine, c'est-à-dire que la protéine normalement ancrée à la membrane plasmique devient une protéine transmembranaire, nommée PrP<sup>Ctm</sup>. Ce changement topologique de PrP<sup>C</sup> est associé à certaines maladies à prion dites génétiques ou familiales (Caughey, 1991, Harris, 2003, Linden et al, 2008, Prusiner & Scott, 1997, Prusiner, 1998).



**Figure 2: Structure secondaire et tertiaire de PrP<sup>C</sup>**

**A.** Schéma de la structure secondaire et tertiaire de PrP<sup>C</sup>. La pro-protéine PrP<sup>C</sup> est constituée de 253 a.a. dont deux peptides signaux permettant son ancrage et routage au RE (a.a. 1-22) et un autre en C-terminal (231-253) qui induit l'ajout de l'ancre GPI. Le peptide signal N-terminal est suivi d'une région polybasique qui est cruciale pour l'endocytose de PrP<sup>C</sup>. Les deux peptides signaux sont clivés suite à l'ancrage de la pro-protéine PrP à la membrane du RE. Ainsi, PrP<sup>C</sup> mature est composé de 208 a.a. (23-231). Deux domaines de PrP<sup>C</sup> sont connus pour être hautement conservés soit le domaine OR (a.a. 51-90) et le domaine CC et hydrophobe (95-134 a.a.). La structure tertiaire de PrP<sup>C</sup> est composée d'un long domaine N-terminal non structuré et un domaine C-terminal composé de trois hélices α et de deux feuillets β. **B.** Topologie physiologique et pathologique de PrP<sup>C</sup>. Normalement, PrP<sup>C</sup> est ancrée à la membrane du RE via une ancre GPI. Cependant, un faible pourcentage de PrP peut adopter l'autre topologie, c'est-à-dire que PrP devient une protéine transmembranaire avec son domaine C-terminal dans la lumière du RE et est nommée PrP<sup>ctm</sup>. Plusieurs mutations pathologiques sont connues pour soit favoriser la formation de cette topologie ou encore affecter son métabolisme (routage/dégradation).

### 1.2.2. PrP<sup>C</sup> et le système endolysosomal

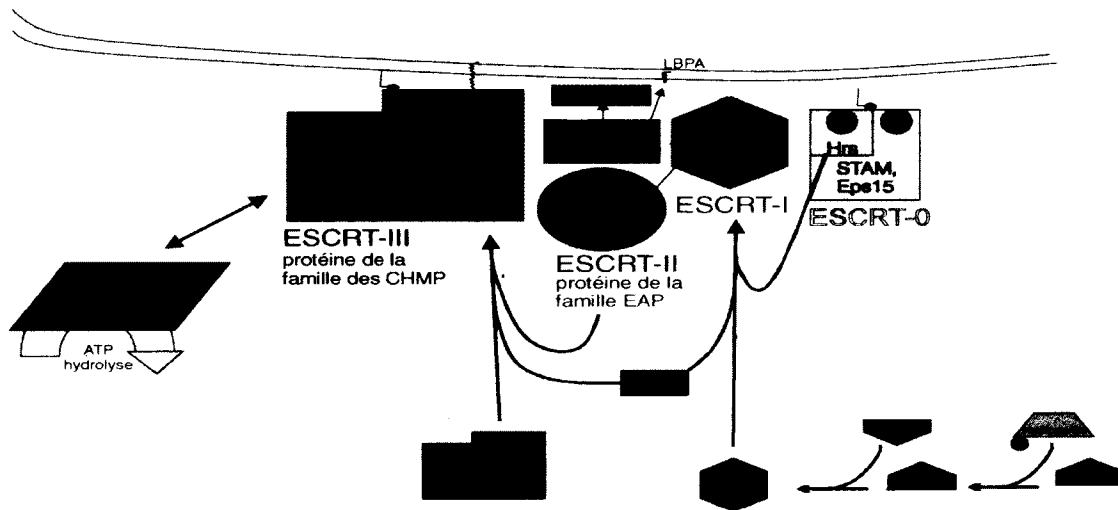
PrP<sup>C</sup> se localise majoritairement à la membrane plasmique mais elle est aussi associée à d'autres compartiments intracellulaires tels que le RE et l'appareil de Golgi lors de son routage vers la membrane plasmique. PrP<sup>C</sup> est endocytée par plusieurs mécanismes dépendamment des stimuli, du type cellulaire et des partenaires d'interaction. Par exemple, l'exposition des cellules neuronales au cuivre induit l'endocytose de PrP<sup>C</sup> par un mécanisme clathrine dépendant chez les cellules neuronales (décrit dans la section

1.2.3.3.1.). Suite à son entrée dans le système endolysosomal, PrP<sup>C</sup> se retrouve au niveau des endosomes précoces (Harris, 2003, Lee et al, 2001, Magalhaes et al, 2002, Magzoub et al, 2006, Nunziante et al, 2003). PrP<sup>C</sup> peut être ensuite soit recyclée à la membrane plasmique via les endosomes de recyclage ou encore routée vers les endosomes tardifs puis les corps multivésiculaires (*multivesicular bodies* (MVBs)) (Harris, 2003, Magzoub et al, 2006, Nunziante et al, 2003). Lors de la maturation des MVBs, il y a recrutement de complexes protéiques nommés ESCRT 0-III (Endosomal sorting complex required for transport) (Figure 3). Ces complexes permettent la maturation adéquate des MVBs et la formation de petites vésicules internes aux MVBs dont les exosomes (Babst, 2011, Hanson & Cashikar, 2012, Henne et al, 2011, Woodman & Futter, 2008). Ce recrutement dépend de différentes modifications post-traductionnelles des protéines contenues dans les complexes ESCRT et des protéines associées aux ESCRT. Le complexe ESCRT-0 est constitué des protéines Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), STAM (signal transducing adaptor molecule) et Esp15 (EGFR Protein tyrosine kinase Substrate 15). HRS initie le processus de maturation en s'associant avec la membrane des endosomes via son interaction avec les protéines/récepteurs ubiquitinylés. Hrs recrute également les protéines STAM et Eps et forment ainsi le complexe ESCRT à la membrane des endosomes. Le complexe ESCRT-0 est nécessaire pour une maturation adéquate des MVBs puisqu'il regroupe les protéines/récepteurs ubiquitinylés sur la membrane des endosomes afin de les diriger vers les MVBs et les lysosomes pour leur dégradation. Le complexe ESCRT-0 avec la protéine Alix recrutent les protéines Tsg101 (tumor suppressor growth 1) et Vps28 (Vacuolar protein sorting) (complexe ESCRT-I) (Katzmann et al, 2002, Pelchen-Matthews et al, 2004, Saksena et al, 2007). Tsg101 a été préalablement monoubiquitinylé par la protéine mahogunin ce qui permet à la protéine Tsg101 d'interagir avec Vps28, Alix et le complexe ESCRT-0 (plus particulièrement HRS) au niveau des endosomes/MVBs et de former ainsi le complexe ESCRT-I (Dores et al, 2012, Dores et al, 2012, Dowlatshahi et al, 2012, Hurley, 2010, Hurley & Odorizzi, 2012, Jiao et al, 2009a, Jiao et al, 2009b, Kim et al, 2007a, Mattei et al, 2006, McCullough et al, 2008, Sette et al, 2010). La protéine Tsg101 recrute également les protéines de la famille EAP

(ELL-associated proteins) formant le complexe ESCRT-II. Les complexes ESCRT-I et ESCRT-II sont également impliqués dans le regroupement des protéines/récepteurs ubiquitinilés au niveau de la membrane des MVBs. Par la suite, le complexe ESCRT-II avec l'aide d'Alix induit le recrutement des protéines de la famille des CHMP (chromatin-modifying protein/charged multivesicular body protein) à la membrane des MVBs afin de former le complexe ESCRT-III. Alix et d'autres membres des ESCRTs induisent également l'enrichissement de certains lipides dans la membrane des MVBs afin de favoriser la courbure et la formation des vésicules intraluminales. Par exemple, Alix enrichit le lipide LBPA (acide lysobisphosphatidique) au niveau de la membrane des MVBs. Le LBPA est un lipide caractéristique des MVBs. Le complexe ESCRT-III avec l'aide de l'endophylin qui a été préalablement recrutée par Alix, induit la déformation (la courbure) de la membrane des MVBs afin d'initier la formation des vésicules intraluminales dont font partie les exosomes. Le complexe ESCRT-III est essentiel pour la maturation adéquate des MVBs puisqu'il possède l'activité de coupure de la membrane des MVBs ce qui permet de former les vésicules intraluminales. La dissociation des complexes ESCRTs de la membrane des MVBs est induite par les protéines Vps4A et Vps4B (Figure 3). Les MVBs vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique ou encore avec la membrane des lysosomes afin d'induire respectivement le relâchement des exosomes dans l'espace extracellulaire ou la dégradation de leur contenu dont PrP<sup>C</sup> (Harris, 2003, Magzoub et al, 2006, Nunziante et al, 2003). Les exosomes sont de petites vésicules de 20-150 nm sécrétés dans l'espace extracellulaire et sont impliqués dans la communication intercellulaire (Corrado et al, 2013, Turola et al, 2012, Verweij et al, 2012, Vlassov et al, 2012). Ils permettent le transfert entre cellules de certains miARN, ARNm et protéines pouvant ainsi moduler l'activité cellulaire des cellules hôtes. Par exemple, l'interaction entre les exosomes et la cellule hôte favorise la neuroprotection et la survie cellulaire par l'activation de voie signalétique dépendante de PrP<sup>C</sup> (Beraldo et al, 2013, Caetano et al, 2008, Hajj et al, 2013, Lopes et al, 2005, Roffe et al, 2010, Zanata et al, 2002). En plus de PrP<sup>C</sup>, les exosomes contiennent aussi l'agent infectieux des ESTs nommé PrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) et sont donc impliqués dans l'infectivité et la progression des ESTs (Alais et al,



2008, Bellingham et al, 2012, Fevrier et al, 2004, Porto-Carreiro et al, 2005, Robertson et al, 2006, Vella et al, 2007).



**Figure 3 : Maturation des MVBs par les ESCRTs**

La maturation des MVBs dépend du recrutement des complexes ESCRT 0-III. Le recrutement des différents ESCRT à la membrane des MVBs se fait de façon séquentielle et dépend des ESCRT précédent. La protéine HRS interagit avec la membrane des endosomes précoces et initie la maturation des endosomes précoces en MVBs. HRS recrute les protéines STAM et Eps15 afin de former le complexe ESCRT-0. Le complexe ESCRT-0 est crucial pour la maturation des MVBs puisqu'il interagit et regroupe les protéines/récepteurs ubiquitinilés au niveau de la membrane des endosomes afin de les diriger vers les MVBs et éventuellement fusionner avec les lysosomes pour induire leur dégradation. Par la suite, la protéine Tsg101 est monoubiquitinylée par l'ubiquitine ligase Mahogunin. Ainsi, TSG101 peut interagir avec la protéine Vps28 (protéine du complexe ESCRT-I), la protéine HRS du complexe ESCRT-0 et la protéine Alix ce qui permet induire la formation du complexe ESCRT-I à la membrane du MVBs. Le complexe ESCRT-I est également impliqué dans le regroupement des protéines/récepteurs ubiquitinilés au niveau la membrane des endosomes/MVBs. En plus, le complexe ESCRT-I, plus particulièrement Tsg101, recrute les protéines de la famille des EAP à la membrane du MVBs et permet ainsi la formation du complexe ESCRT-II. Le complexe ESCRT-II avec l'aide d'Alix recrutent les protéines de la famille des CHMP à la membrane des MVBs afin de former le complexe ESCRT-III. Alix et d'autres membres des ESCRTs induisent également l'enrichissement de certains lipides dans la membrane des MVBs afin de favoriser la courbature et la formation des vésicules intraluminales. Par exemple, Alix enrichie la présence du LBPA (lysobisphosphatidic acid) au niveau des MVBs et est un lipide

caractéristique des MVBs. Le complexe ESCRT-III avec l'aide de l'endophylin qui est recruté par Alix, induit la déformation (courbature) de la membrane des MVBs afin d'initier la formation des vésicules intraluminales dont font parties les exosomes. Le complexe ESCRT-III possède l'activité de coupure de la membrane invaginée des MVBs ce qui permet de former les vésicules intraluminales des MVBs dont font parties les exosomes. Les protéines Vps4 sont responsables du recyclage des ESCRTs en induisant leur désassemblage.

### 1.2.3. Rôles de PrP<sup>C</sup>

#### 1.2.3.1 Phénotypes et dérèglements observés chez les souris *knockout* pour le gène PRNP

Aucun phénotype majeur sur le développement général et la reproduction n'a été observé chez les souris transgéniques dont le gène PRNP a été supprimé (souris *knock-out* (KO)) (Bueler et al, 1992, Manson et al, 1994, Moore et al, 1999, Prestori et al, 2008). Cependant, plusieurs petites anomalies ont été observées lors du vieillissement des souris, par exemple, une démyélinisation du système nerveux central (Bremer et al, 2010, Katamine et al, 1998, Nishida et al, 1999) . De plus, des études subséquentes ont montré que les souris KO souffrent de troubles du sommeil et du rythme circadien (Huber et al, 2002, Tobler et al, 1996, Tobler et al, 1997), phénotypes normalement attribués à certaines ESTs familiales (Collinge & Palmer, 1994, Landolt et al, 2006, Lugaresi et al, 1998). D'autres études controversées ont montré que les souris KO PrP<sup>C</sup> ont en plus une défaillance dans l'excitabilité neuronale ce qui expliquerait les troubles de la mémoire et d'apprentissage (Colling et al, 1996, Criado et al, 2005, Lledo et al, 1996, Roesler et al, 1999). Il est aussi connu que PrP<sup>C</sup> a un rôle dans la prolifération, la différenciation et le maintien la multipotence des cellules souches hématopoïétiques et neurales (Lee & Baskakov, 2013, Lopes & Santos, 2012, Miranda et al, 2011a, Panigaj et al, 2011, Santos et al, 2011, Steele et al, 2006, Zhang et al, 2006, Zivny et al, 2008). PrP<sup>C</sup> aurait également un rôle dans l'activation de la voie PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt) favorisant la survie cellulaire. Ainsi, le niveau d'activation d'Akt suite à un stress est plus faible chez les souris KO PrP<sup>C</sup>, ce qui augmente la susceptibilité des souris au stress environnementaux

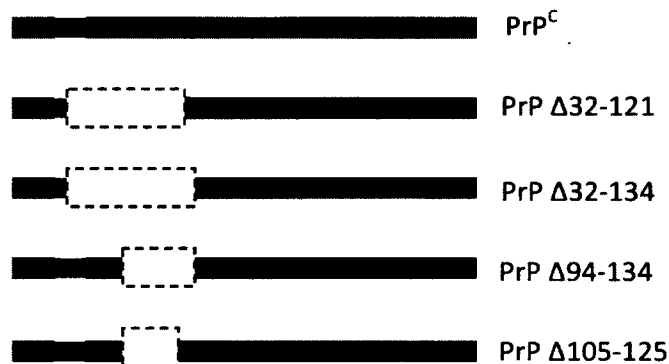
(Chen et al, 2003, Schmalzbauer et al, 2008, Vassallo et al, 2005, Weise et al, 2006). L'effet de PrP<sup>C</sup> sur la voie Akt serait relié sur sa capacité de lier le Cu<sup>2+</sup> (Vassallo et al, 2005). Plusieurs groupes ont montré que les souris KO PrP<sup>C</sup> souffrent d'un déséquilibre de l'homéostasie du Cu<sup>2+</sup> et sont plus susceptibles au stress oxydatif (Brown et al, 1997a, Brown et al, 1997b, Brown et al, 2002, Brown, 2003, Brown, 2004, Klamt et al, 2001, Kralovicova et al, 2009, Pushie et al, 2011, Singh et al, 2010). Malgré l'absence de phénotype sévère dans les souris KO PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>C</sup> semble avoir un rôle important dans la neuroprotection et la survie cellulaire.

### **1.2.3.2. Fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup>**

#### **1.2.3.2.1. Évidence *in vivo* du rôle neuroprotecteur de PrP<sup>C</sup>**

Il est bien établi que PrP<sup>C</sup> joue un rôle neuroprotecteur tant au niveau moléculaire que cellulaire. Deux modèles *in vivo* démontrent bien l'importance de PrP<sup>C</sup> dans la neuroprotection. D'abord les souris transgéniques exprimant des mutants de délétion du domaine N-terminal comprenant la région HD de PrP<sup>C</sup> développent une neurodégénérescence spontanée et rapide (Figure 4) (Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2013, Christensen et al, 2010, Harris, 2003, Massignan et al, Rane et al, 2010, Solomon et al, 2012, Solomon et al, Westergard et al). La délétion du domaine HD induit la perte de la fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> augmentant ainsi la susceptibilité des cellules à différents stress cellulaires tels que le stress oxydatif et le stress thermique (Rambold et al, 2008). De plus, la ré-expression de PrP<sup>C</sup> dans ces souris transgéniques contrebalance la neurotoxicité induite par ces mutants de délétion artificiels de PrP<sup>C</sup> (Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2013, Christensen et al, 2010, Harris, 2003, Massignan et al, Rane et al, 2010, Solomon et al, 2012, Solomon et al, Westergard et al). Le deuxième modèle est une souris transgénique KO PrP<sup>C</sup> dont la protéine Doppel est de manière ectopique dans le cerveau à la suite d'événements d'épissage intergénique entre les gènes de PrP<sup>C</sup> et Doppel (Anderson et al, 2004, Nishida et al, 1999, Valenti et al, 2001). Doppel est une protéine membranaire homologue au domaine C-terminal de PrP<sup>C</sup>

et possède une caractéristique similaire aux mutants de délétion artificiels de PrP<sup>C</sup> soit la délétion du domaine N-terminal de PrP<sup>C</sup>. Ces deux modèles de souris transgéniques démontrent bien l'importance de PrP<sup>C</sup> en particulier de son domaine N-terminal (domaine HD compris) dans sa fonction neuroprotectrice puisque les souris des 2 modèles développent de la neurodégénérescence.



**Figure 4 : PrP<sup>C</sup> et les mutants artificiels de délétion de PrP<sup>C</sup> induisant une neurodégénérescence.**

*PrP<sup>C</sup> sauvage et les différents mutants de délétion possèdent les deux peptides signaux (SP et GPI) permettant sa localisation à la membrane plasmique. Les différents domaines délétés sont représentés par un encadré en pointillé. Les domaines délétés ont en commun une région correspondant au domaine hydrophobe (HD), ce qui lui suggère un rôle crucial dans la neurotoxicité des mutants ou dans la neuroprotection par PrP<sup>C</sup>.*

#### 1.2.3.2.2. Rôle anti-apoptotique

Il a été démontré *in cellulo* que lors de stress cellulaire, PrP<sup>C</sup> se localise au niveau du cytoplasme et interagit avec le facteur pro-apoptotique Bax ce qui inhibe le changement conformationnel de Bax vers sa forme active (apoptotique) favorisant ainsi la survie cellulaire (Jodoin et al, 2007). Cette activité anti-Bax de PrP<sup>C</sup> a été également observée chez la levure (Westergard et al, 2007) ce qui confirme sa fonction neuroprotectrice.

### 1.2.3.2.3. Homéostasie du zinc ( $Zn^{2+}$ )

Récemment, il a été suggéré que PrP<sup>C</sup> jouerait un rôle neuroprotecteur contre l'excès de  $Zn^{2+}$  extracellulaire produit lors de la neurotransmission glutaminergique (Watt & Hooper, 2003) puisque PrP<sup>C</sup> faciliterait la recapture du  $Zn^{2+}$  en augmentant l'acquisition du  $Zn^{2+}$  de façon indépendante de son endocytose (Watt & Hooper, 2003). L'acquisition du  $Zn^{2+}$  par PrP<sup>C</sup> dépend de deux interactions soit l'interaction de son domaine OR avec le  $Zn^{2+}$  et de l'interaction de son domaine polybasique <sup>23</sup>KKRPKP<sup>28</sup> avec deux partenaires d'interaction soit les protéines GluA1 et GluA2. Ces deux protéines sont des composantes du récepteur AMPA (*zinc-permeable  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate*) et sont responsables au niveau des cellules neuronales de l'acquisition du  $Zn^{2+}$ . Cette fonction de PrP<sup>C</sup> dans l'acquisition du  $Zn^{2+}$  permet de maintenir une activité adéquate de certaines enzymes dépendantes du  $Zn^{2+}$  tels que les tyrosines phosphatases (Pushie et al, 2011, Watt & Hooper, 2003, Watt et al, 2012) et les superoxydes dismutases (SOD) dépendantes du  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ . Les SOD sont des enzymes impliquées dans la détoxification du stress oxydatif.

### 1.2.3.3 Homéostasie des métaux ( $Cu^{2+}$ et $Fe^{2+}$ ) et le stress oxydatif

#### 1.2.3.3.1 Homéostasie du $Cu^{2+}$

Il est bien établi que PrP<sup>C</sup> joue un rôle dans l'acquisition du  $Cu^{2+}$  puisque sa liaison au  $Cu^{2+}$  induit son endocytose et le relâchement intracellulaire du  $Cu^{2+}$  (Brown, 1999, Brown, 2004, Brown & Harris, 2003, Brown & Harris, 2003, Pauly & Harris, 1998, Perera & Hooper, 2001, Urso et al, 2010, Urso et al, 2012). Cette activité de PrP<sup>C</sup> dépend de deux domaines soit son domaine OR qui possède quatre sites de liaison au  $Cu^{2+}$  (Brown et al, 1997a, Burns et al, 2002, Burns et al, 2003, Garnett & Viles, 2003, Hornshaw et al, 1995, Perera & Hooper, 2001) et d'une région polybasique (<sup>23</sup>KKRPKP<sup>28</sup>). Cette région polybasique est impliquée dans l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec les cofacteurs responsables de son endocytose (Hooper et al, 2008, Parkyn et al, 2008, Taylor et al, 2005, Taylor & Hooper, 2007). Au niveau des cellules neuronales, la liaison de PrP<sup>C</sup> au  $Cu^{2+}$  induit son endocytose par un

mécanisme clathrine dépendant non conventionnel, c'est-à-dire l'interaction entre PrP<sup>C</sup> et le Cu<sup>2+</sup> induit un changement de localisation membranaire de PrP<sup>C</sup>. PrP<sup>C</sup> transloque des radeaux lipidiques (microdomaine de la membrane plasmique) vers une région qui ne l'est pas, pour être ensuite internalisée par la voie clathrine (Hooper et al, 2008, Sunyach et al, 2003, Taylor et al, 2005). Ce mécanisme non conventionnel d'endocytose clathrine dépendante de PrP<sup>C</sup> est stimulé par certains cofacteurs transmembranaires, en particulier la protéine LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*). LRP-1 se localise au niveau des régions de la membrane plasmique qui ne sont pas des radeaux lipidiques et interagit avec certaines protéines des radeaux lipidiques (Wu & Gonias, 2005) permettant ainsi leur translocation et endocytose par la voie clathrine-dépendante, comme la protéine uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) (Nykjaer & Willnow, 2002, Stahl & Mueller, 1995) et PrP<sup>C</sup> (Hooper et al, 2008, Parkyn et al, 2008, Taylor & Hooper, 2007). Certaines études ont montré que PrP<sup>C</sup> et particulièrement le domaine OR possède une activité réductase permettant de réduire le Cu<sup>2+</sup> avant son relargage cytosolique afin de le rendre biologiquement disponible (Brown & Harris, 2003, Miura et al, 2005, Singh et al, 2010).

Malgré l'importance de PrP<sup>C</sup> dans l'acquisition du Cu<sup>2+</sup>, de minimes différences dans la concentration de Cu<sup>2+</sup> ont été observées entre le cerveau des souris sauvages et des souris transgéniques KO PrP<sup>C</sup> (Giese et al, 2005). Ces résultats suggèrent que PrP<sup>C</sup> aurait un rôle dans l'homéostasie général du Cu<sup>2+</sup> (Kralovicova et al, 2009, Urso et al, 2010, Urso et al, 2012, Varela-Nallar et al, 2006b). Une étude récente a démontré que PrP<sup>C</sup> affecte l'expression de protéines responsables du relargage extracellulaire du Cu<sup>2+</sup> (DMT-1, Atox1 et MNK-ATPase) et du relargage des réservoirs cytoplasmiques de Cu<sup>2+</sup> contenu dans les diverses organites (CTR2) (Kralovicova et al, 2009). La diminution de l'expression de ces protéines clés dans l'homéostasie du Cu<sup>2+</sup> permet de maintenir une concentration intracellulaire adéquate de Cu<sup>2+</sup> ce qui pourrait expliquer les petites différences observée entre les souris sauvages et KO PrP<sup>C</sup>. Tandis que l'augmentation de l'expression de PrP<sup>C</sup> augmente non seulement la concentration intracellulaire de Cu<sup>2+</sup> mais aussi l'expression

des protéines Atox1 et CTR2 permettant un rétablissement rapide de la concentration intracellulaire de  $\text{Cu}^{2+}$  (Kralovicova et al, 2009).

#### 1.2.3.3.2 Homéostasie du $\text{Fe}^{2+}$

PrP<sup>C</sup> joue également un rôle important dans l'homéostasie du fer. Cependant, contrairement au  $\text{Cu}^{2+}$ , PrP<sup>C</sup> ne se lierait pas directement au  $\text{Fe}^{2+}$  mais régulerait plutôt l'homéostasie du  $\text{Fe}^{2+}$  en affectant l'expression et l'activité de certaines protéines clés de l'homéostasie du  $\text{Fe}^{2+}$ , telles que la transferrine ou son récepteur, la ferritine et l'hème (Bhupanapadu Sunkesula et al, 2010, Lee et al, 2007, Singh et al, 2009b, Singh et al, 2009c, Singh et al, 2010). De plus, malgré un niveau global de  $\text{Fe}^{2+}$  semblable au souris sauvages, les souris KO PrP<sup>C</sup> souffrent d'une dérégulation de l'homéostasie du  $\text{Fe}^{2+}$  se traduisant par un déséquilibre du niveau de  $\text{Fe}^{2+}$  dans certaines régions du cerveau, une diminution de l'absorption du  $\text{Fe}^{2+}$  au niveau du petit intestin, une diminution du  $\text{Fe}^{2+}$  dans certains organes tels que la rate et le foie et certains problèmes d'anémie (Singh et al, 2009b, Singh et al, 2009c). PrP<sup>C</sup> augmenterait l'absorption et le transport du  $\text{Fe}^{2+}$  au niveau de la lumière du duodénum vers la membrane basolatérale et ultimement vers le sang et les organes appropriés (Singh et al, 2009b, Singh et al, 2009c, Singh et al, 2009c, Singh et al, 2010). De plus, l'induction de l'endocytose de PrP<sup>C</sup> au niveau des cellules neuronales favorise l'acquisition et le stockage intracellulaire de  $\text{Fe}^{2+}$  ce qui augmente le pool labile intracellulaire (LIP) du  $\text{Fe}^{2+}$  et la saturation de la ferritine en  $\text{Fe}^{2+}$  (Singh et al, 2009b, Singh et al, 2009c). Il est à noter que le domaine de PrP<sup>C</sup> responsable de son rôle dans l'homéostasie du  $\text{Fe}^{2+}$  est le OR puisque sa délétion diminue le niveau de LIP et de ferritines liées au  $\text{Fe}^{2+}$  (Singh et al, 2009b, Singh et al, 2009c). PrP<sup>C</sup> possède également une activité ferriréductase (Das et al, 2010, Singh et al, 2013), c'est-à-dire que PrP<sup>C</sup> réduit le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  avant sa libération cytoplasmique et son transfert à des protéines liants le  $\text{Fe}^{2+}$ . Ce rôle de PrP<sup>C</sup> pourrait expliquer pourquoi l'expression de PrP<sup>C</sup> est augmentée lors d'un excès de  $\text{Fe}^{3+}$ .

PrP<sup>C</sup> joue donc un rôle important dans la réponse au stress oxydatif en régulant l'homéostasie des métaux tels que le cuivre (Cu<sup>2+</sup>) et le fer (Fe<sup>2+</sup>). Ces métaux sont connus pour favoriser la production d'espèces d'oxygène réactives (ROS) par la réaction de fenton et conséquemment contribuer au stress oxydatif. En plus, PrP<sup>C</sup> régule directement la réponse au stress oxydatif en augmentant l'activité et/ou l'expression de certaines protéines clés de la réponse au stress oxydatif tels que les SOD ce qui supporte sa fonction neuroprotectrice.

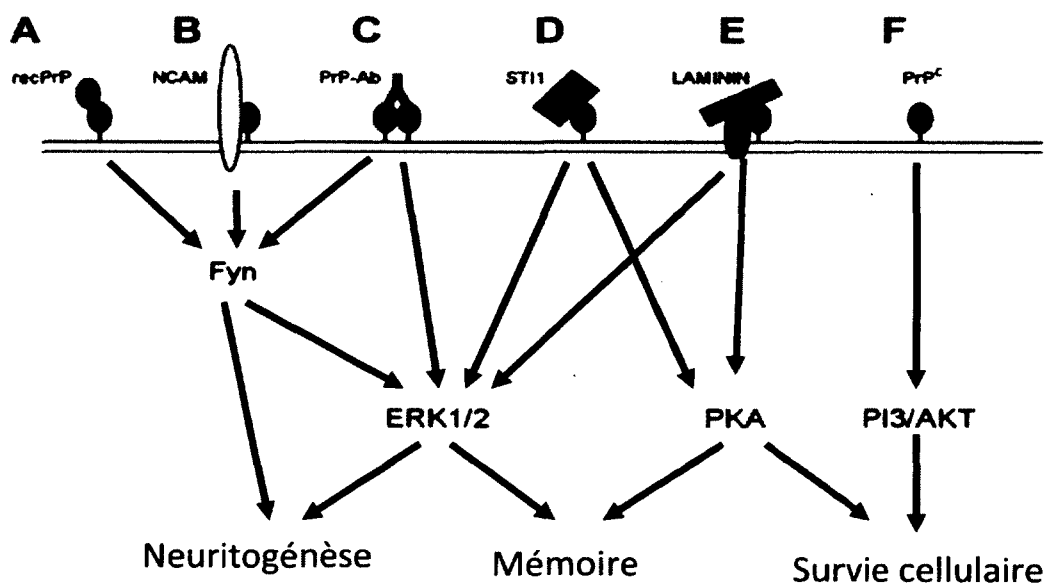
### 1.2.3.3.3 Stress oxydatif

PrP<sup>C</sup> n'a pas seulement un rôle dans l'homéostasie des métaux mais elle permet également de diminuer directement le stress oxydatif. Par exemple, lors d'un excès de Cu<sup>2+</sup>, l'expression de PrP<sup>C</sup> est induite par l'activation de la voie ATM/Sp1/p53 (ATM, *ataxia-telangiectasia mutated*) (Qin et al, 2009). Cette augmentation de l'expression de PrP<sup>C</sup> est essentielle pour diminuer la production d'espèce oxygène réactif (ROS) et pour rétablir la concentration intracellulaire de Cu<sup>2+</sup> ce qui promeut la survie cellulaire. En plus, PrP<sup>C</sup> rétro-inhibe l'activation de la voie ATM favorisant ainsi la survie cellulaire puisqu'une suractivation de la voie ATM induit la mort cellulaire (Qin et al, 2009). L'augmentation de l'expression de PrP<sup>C</sup> induit également l'expression et l'activité de certaines enzymes clés impliquées dans la réponse au stress oxydatif telles que les enzymes SOD ce qui réduit le stress oxydatif et les dommages cellulaires qui lui sont associés (Kralovicova et al, 2009, Urso et al, 2010, Urso et al, 2012, Varela-Nallar et al, 2006b). En plus, il est connu que PrP<sup>C</sup> possède en elle-même une activité SOD contribuant ainsi à la diminution du stress oxydatif et à la survie cellulaire (Brown et al, 1997b, Brown et al, 1999, Haraguchi et al, 1989, Urso et al, 2012). Ces différentes études démontrent bien l'importance de PrP<sup>C</sup> dans l'homéostasie des métaux et dans la réponse au stress oxydatif et lui suggèrent donc un rôle de senseur de stress.



### 1.2.3.4. Partenaires protéiques et les voies signalétiques

PrP<sup>C</sup> interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et dans l'expansion et la maintenance des neurites (Didonna, 2013, Schneider et al, 2011). Les différentes études de partenaires d'interaction et des voies signalétiques ont mis en évidence que PrP<sup>C</sup> régule principalement l'activité de trois kinases centrales soit ERK1/2, PKA et AKT. L'activation de ces kinases se fait par l'induction de différentes voies signalétiques en aval de ces kinases (Figure 5) (Didonna, 2013, Schneider et al, 2011).



**Figure 5 : Principales voies d'activation dépendantes de l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec ses partenaires**

PrP<sup>C</sup> induit principalement l'activation de trois voies signalétiques soit les kinases ERK1/2, PKA et PI3K/Akt. L'activation de ces voies signalétiques favorise la différenciation cellulaire (neuritogénèse), la mémoire et la survie cellulaire. De plus, l'activation de ces voies signalétiques par PrP<sup>C</sup> est induite dans différentes conditions cellulaires soit par l'ajout de PrP recombinant soluble (A) ou d'anticorps reconnaissant spécifiquement PrP<sup>C</sup> (C) induisant la dimérisation de PrP<sup>C</sup> ou par son interaction avec différents ligands physiologiques comme NCAM (B), ST11 (D), laminine (E). De plus, l'effet de PrP<sup>C</sup> sur les voies signalétiques a aussi été observé en comparant les animaux sauvages aux différents modèles d'animaux déficients en PrP<sup>C</sup> (F). (Adapté de Didonna, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2013.)

Par exemple, l'interaction entre PrP<sup>C</sup> et la laminine, protéine de la matrice extracellulaire, induit la croissance des neurites et la consolidation de la mémoire par l'activation des voies dépendantes de PKA et ERK (Coitinho et al, 2006, Didonna, 2013, Gauczynski et al, 2001, Graner et al, 2000, Schneider et al, 2011). Cette interaction dépend d'autres partenaires d'interaction communs à PrP<sup>C</sup> et à la laminine comme la phosphatase alcaline TNAP (*tissu-non specific alkaline phosphatase*) et la protéine transmembranaire  $\beta$ -dystroglycan (Ermonval et al, 2009, Keshet et al, 2000, Schneider et al, 2011). D'autres études ont montré que PrP<sup>C</sup> interagit directement avec la protéine NCAM et favorise la translocation de l'isoforme transmembranaire de NCAM et du récepteur tyrosine phosphatase  $\alpha$  (RPTP $\alpha$ ) au niveau des radeaux lipidiques. Cette translocation de NCAM et de RPTP $\alpha$  induit l'activation de la protéine Fyn, membre de la famille des tyrosines kinases Src, et des MAP kinase ERK1/2 se trouvant en aval de Fyn. Cette activation de la voie Fyn-ERK1/2 favorise l'élongation des neurites (Didonna, 2013, Kanaani et al, 2005, Santuccione et al, 2005). Un autre partenaire d'interaction de PrP<sup>C</sup> qui est beaucoup étudié pour son implication dans la survie neuronale et la neuritogénèse est la protéine STI-1 (stress-inducible 1). STI-1 est une co-chaperonne sécrétée par les astrocytes et interagit avec PrP<sup>C</sup> au niveau de la membrane plasmique des neurones. Cette interaction de PrP<sup>C</sup> avec STI-1 induit l'activation des voies signalétiques de PKA et ERK1/2, ce qui promeut respectivement la survie neuronale et la neuritogénèse (Beraldo et al, 2013, Caetano et al, 2008, Lopes et al, 2005, Roffe et al, 2010, Zanata et al, 2002). Certaines études ont montré que l'activation des MAPK ERK1/2 par PrP<sup>C</sup> augmente l'activation du facteur de transcription CREB (*cAMP-responsive element binding protein*). CREB induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire, la différenciation, la prolifération et la plasticité/excitabilité neuronale (Pradines et al, 2008, Schneider et al, 2011). De plus, des récentes approches globales ont mis en évidence de nouveaux partenaires d'interaction de PrP<sup>C</sup> tels que les protéines de la famille des glycoprotéines neuronales et des protéines associées à la myéline ce qui lui suggère dans la maintenance de l'intégrité de la myéline (Rutishauser et al, 2009, Schneider et al, 2011).

En résumé, malgré l'absence de phénotypes sévères associés aux souris KO PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>C</sup> est impliqué dans divers processus cellulaires importants pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, la neuroprotection, la prolifération et la différenciation des cellules neuronales ainsi que pour la survie cellulaire. Plusieurs de ces processus sont altérés dans les maladies à prion et seraient responsables de la neurodégénérescence.

## 2. Les maladies à prion

Les maladies à prion ou les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) sont des maladies neurodégénératives infectieuses et fatales qui affectent une à deux personnes par millions dans la population mondiale. Au Canada, cela représente environ 35 personnes par an. Les ESTs progressent lentement avec une longue période de latence suivie d'une neurodégénérescence rapide. Parmi les caractéristiques pathologiques des ESTs, on note le dépôt de plaques extracellulaires composées d'une forme anormalement repliée de PrP<sup>C</sup> nommée PrP<sup>Sc</sup>. On retrouve également une vacuolisation et une neurodégénérescence du cerveau, ce qui lui confère son aspect spongieux, et enfin, une astroglie c'est-à-dire une prolifération anormale des astrocytes. La neurodégénérescence peut affecter différentes régions du cerveau comme l'hippocampe, le thalamus et le cervelet mais aussi la moelle épinière (Budka, 1997, Budka, 2000, Richardson & Masters, 1995, Wadsworth et al, 2003). Les ESTs les plus répandues chez les animaux sont la tremblante du mouton (*scrapie*), la maladie débilante chronique des cervidés et l'encéphalopathie spongiforme bovine (BSE). De plus, il est connu que la BSE est transmissible à l'homme, ce qui explique les impacts socio-économiques néfastes qu'ont engendrés ces ESTs.

### 2.1. Les ESTs humaines

Les principales ESTs humaines sont : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (FFI), le Kuru, la maladie de la variante de CJD (vCJD) (Tables 1). Les ESTs sont classées selon leur mode d'acquisition, soit les formes sporadiques, les formes génétiques et les formes

acquises par transmission entre individus ou espèces. Ces différentes ESTs représentent respectivement 85%, 10-15% et moins de 5% des cas d'ESTs (Collinge & Palmer, 1994, Collinge, 1997, Prusiner, 1989, Prusiner & Scott, 1997, Wadsworth et al, 2003, Wadsworth & Collinge, 2007). Les ESTs acquises par interventions chirurgicales sont connues sous le nom d'iatrogéniques (Table 1)

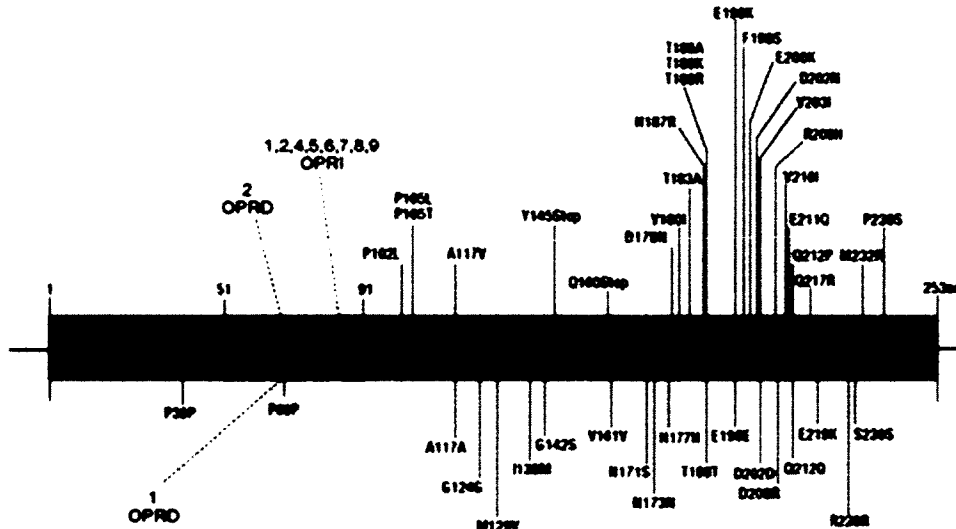
**Table 1 : Classification, aspects cliniques et neuropathologiques des ESTs humaines**

Mode de transmission	phénotype	fréquence	Signes cliniques			Signes neuropathologique	
			Âge	Durée vie	Symptomes cliniques	Histopathologie	Test biochimique
Sporadique	sCJD	85%	60-70	6 mois	Démence et signes neurologiques (myoclonie, ataxie du cervelet et problème de vision)	Vacuolisation, perte neuronale, astroglie et dépôt de PrP <sup>Sc</sup> (plusieurs patrons)	Détermination de la souche de PrP <sup>Sc</sup> par WB
Héréditaire	fCJD	10-15%	50-60	6 mois	Similaire au sCJD	Similaire au sCJD	
	GSS		50-60	5-6 ans	Dysfonctionnement du cervelet (Ataxie)	Similaire au sCJD mais avec des plaques multicentriques	
	FFI		50	13-15 mois	Insomnie et perte d'autonomie	Implique le thalamus	
Acquise par infection	vCJD	< 1%	26	14 mois	Problème psychiatrique suivi d'un déficit neurologique et perte cognitive	Similaire au sCJD mais avec des plaques florides	
	Kuru		---	6 mois	Similaire aux sCJD	Similaire au sCJD	
	Iatrogénique		---	6 mois	Similaire aux sCJD	Similaire au sCJD	

L'EST sporadique la plus commune est la maladie sporadique CJD (sCJD) (Table 1) et elle se caractérise par une démence sévère accompagnée d'une myoclonus et d'un trouble du sommeil. Normalement, la mort des individus se produit en moyenne 6 mois après les premiers symptômes de la maladie (Gambetti et al, 2003, Glatzel et al, 2005). L'âge des individus diagnostiqués se situe généralement entre 45 et 75 ans. L'origine des ESTs

sporadiques demeure indéterminée (Collinge, 1997, Wadsworth & Collinge, 2007). Cependant des changements physico-chimiques dans l'environnement cellulaire comme une dérégulation des métaux peuvent engendrer la formation de PrP<sup>Sc</sup> (Redecke et al, 2007, Singh et al, 2010). De plus, certains polymorphismes de PrP<sup>C</sup> influencent la susceptibilité de l'hôte à développer une EST sporadique. Par exemple, les individus homozygotes pour le polymorphisme méthionine ou valine au codon 129 sont plus susceptible aux ESTs sporadiques que les individus hétérozygotes (Collinge et al, 1991, Mead et al, 2003, Palmer et al, 1991, Wadsworth & Collinge, 2007, Windl et al, 1996).

Les formes génétiques ou familiales des ESTs sont sous-divisées en trois phénotypes soit les maladies de CJD familial (fCJD), de GSS et de FFI (Tables 1). Ces maladies sont causées par des mutations dans le gène PRNP, principalement dans le domaine C-terminal de PrP<sup>C</sup>. Environ 30 mutations ont été identifiées (Figure 6). De plus, la délétion et l'insertion d'octapeptides au niveau du domaine OR de PrP<sup>C</sup> chez certains patients sont aussi associées à des ESTs génétiques (Goldfarb et al, 1991, Laplanche et al, 1990, Owen et al, 1989) (Figure 6).



**Figure 6 : Mutations associées à PrP<sup>C</sup>.**

*Haut : mutations pathologiques. Bas : polymorphisme. OPR1 : insertion d'un octapeptide répété. OPRD : délétion d'un octapeptide répété.*

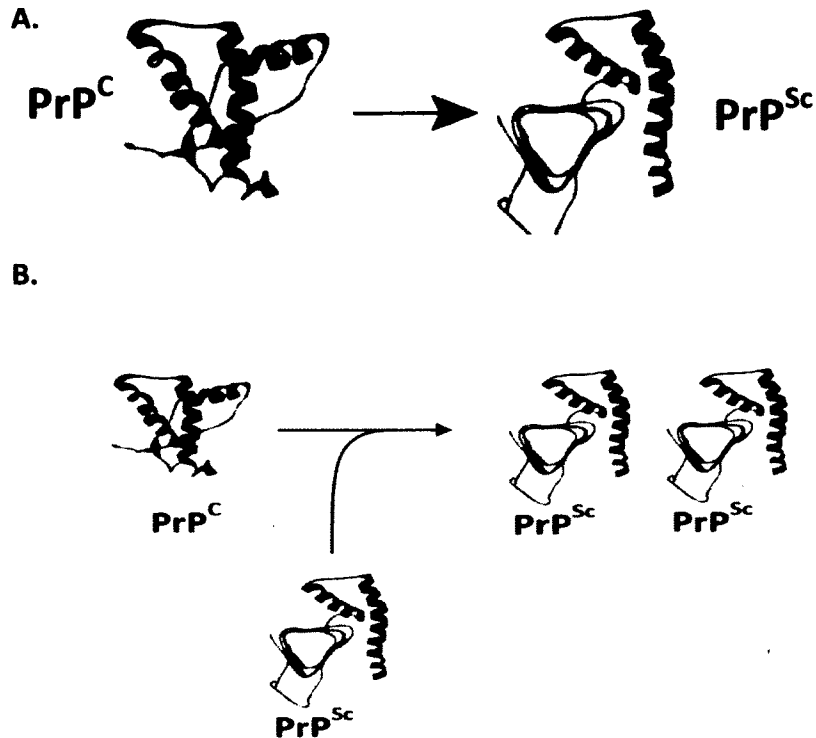
Le mode d'hérédité des ESTs génétiques est du type autosomal dominant, donc les mutants familiaux inhibent l'activité de l'allèle sauvage (Glatzel et al, 2005, Harder et al, 1999). Très peu de différences au niveau du phénotype sont observées entre les formes sporadiques et génétiques des CJDs (Glatzel et al, 2005, Harder et al, 1999, Windl et al, 1999). Cependant, contrairement aux ESTs sporadiques, les ESTs génétiques peuvent être diagnostiquées par un simple test de séquençage. Plusieurs fCJD sont aussi associées à certaines mutations ponctuelles dans la région C-terminale de PrP<sup>C</sup> (Goldfarb et al, 1990, Hsiao & Prusiner, 1990, Hsiao et al, 1991, Hsiao et al, 1991). Le syndrome de GSS est caractérisé par une ataxie cérébrale lente, d'une détérioration cognitive de l'individu et de la formation de plaques amyloïdes de PrP<sup>Sc</sup> (Ghetti et al, 1995, Glatzel et al, 2005, Piccardo et al, 1995). De plus, certaines mutations se localisent au niveau du domaine hydrophobe de PrP<sup>C</sup> et elles sont connues pour induire un changement topologique de PrP<sup>C</sup>. Par exemple, les mutants familiaux P102L, G114V et A117V favorisent le changement topologique de PrP<sup>C</sup> qui se traduit par un changement important du mode d'ancrage de PrP<sup>C</sup> à la membrane puisque la protéine PrP<sup>C</sup> devient une protéine transmembranaire,

nommée PrP<sup>Ctm</sup> (Hornemann et al, 2009, Rane et al, 2010). Enfin, une seule mutation familiale est connue pour engendrer la maladie FFI, la mutation D178N avec un polymorphisme homozygote pour la méthionine 129. La maladie de FFI se caractérise par une perturbation du cycle du sommeil, de l'insomnie incurable, de la démence, une dégénérescence sélective du thalamus, une surstimulation lymphatique et un dépôt extracellulaire de plaques amyloïdes de PrP<sup>Sc</sup> au niveau du thalamus (Goldfarb et al, 1992, Medori et al, 1992, Padovani et al, 1998).

Les ESTs acquises par transmission représentent moins de 1 % des cas (Table 1) mais elles sont la cause première de l'engouement des chercheurs et des gouvernements pour le domaine des prions. La plus connue des ESTs acquises par transmission est la maladie vCJD puisqu'elle provient de la transmission de la BSE à l'homme. L'épidémie de BSE et sa capacité de se transmettre à l'homme révèlent bien les impacts socio-économiques possibles des ESTs. De plus, la maladie de Kuru est bien documentée et est connue pour avoir décimée des villages de la Papouasie-Nouvelle-Guinée. Les chercheurs ont démontré qu'elle a été transmise entre les individus lors de rituels de cannibalisme (Gajdusek & Alpers, 1972). Contrairement aux sCJD et fCJD, la maladie de vCJD progresse plus rapidement et peut affecter des jeunes adultes.

## **2.2. La protéine prion infectieuse *scrapie*, PrP<sup>Sc</sup>**

Au cours des dernières décennies, beaucoup d'études ont été entreprises afin de caractériser l'agent infectieux de la maladie nommée PrP<sup>Sc</sup>. La formation de PrP<sup>Sc</sup> est induite par un changement conformationnel de PrP<sup>C</sup> se traduisant par la conversion d'une hélice  $\alpha$  et de la partie N-terminale non structurée en feuillet  $\beta$ . PrP<sup>C</sup> étant une protéine riche en hélice  $\alpha$  devient donc PrP<sup>Sc</sup>, une protéine riche en feuillet  $\beta$  (Pan et al, 1993) (Figure 7A).



**Figure 7: Conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> et propagation de PrP<sup>Sc</sup>**

**A.** La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induit un changement conformationnel de PrP<sup>C</sup>, c'est-à-dire PrP<sup>C</sup> étant une protéine riche en hélice alpha devient PrP<sup>Sc</sup>, une protéine riche en feuillet bêta. En fait, la partie non structurée de PrP<sup>C</sup> et une des hélices alpha se transforme en feuillet bêta. **B.** Modèles de la propagation de PrP<sup>Sc</sup> au niveau moléculaire. La transmission moléculaire de PrP<sup>Sc</sup> (réplication) dépend de son pouvoir d'induire un changement conformationnel du PrP<sup>C</sup> endogène en sa forme infectieuse PrP<sup>Sc</sup>, un processus nommé *seeding*. Lors du processus d'amplification, PrP<sup>Sc</sup> se retrouve sous plusieurs formes, c'est-à-dire sous formes monomériques, oligomériques et de fibres amyloïdes.

Ce changement conformationnel de PrP<sup>C</sup> induit plusieurs changements physico-chimiques de la protéine. Contrairement à PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup> est beaucoup plus susceptible à l'agrégation (Malolepsza et al, 2005), elle est insoluble à certains détergents non ionique et est résistante à la digestion par la protéinase K et aux différentes méthodes classiques de stérilisation. De plus, PrP<sup>Sc</sup> peut se retrouver sous différentes formes c'est-à-dire sous formes de monomères, d'oligomères et de fibres ou de plaques amyloïdes. Il a été démontré que les plus petites particules infectieuses constituées d'oligomères de 14 à 28

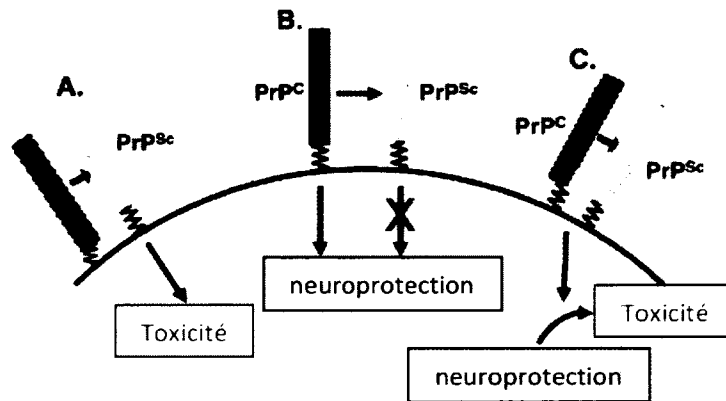


molécules de PrP<sup>Sc</sup> sont les plus infectieuses (Silveira et al, 2005). Il est bien établi que l'infectivité et la neurotoxicité de PrP<sup>Sc</sup> dépend de l'expression de PrP<sup>C</sup> puisque les souris KO PrP<sup>C</sup> sont résistantes à une infection expérimentale avec PrP<sup>Sc</sup> (Fischer et al, 1996, Mallucci et al, 2003, Weissmann et al, 1998, Weissmann & Flechsig, 2003). Il a été démontré que PrP<sup>Sc</sup> s'amplifie et se propage dans l'organisme par sa capacité de convertir PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (Figure 7B). Ce processus est appelé le *seeding* et permet d'expliquer la nécessité de l'expression de PrP<sup>C</sup> pour développer une EST (Bieschke et al, 2004, Polymenidou & Cleveland, 2012, Rubenstein et al, 2007, Thorne & Terry, 2008). De plus, il est clairement établi que PrP<sup>Sc</sup> est seulement responsable de la transmission et la propagation de la maladie mais pas de la neurodégénérescence. Par exemple, l'inhibition conditionnelle de l'expression de PrP<sup>C</sup> 8 semaines post-infection renverse le phénomène de vacuolisation et de neurodégénérescence malgré la présence de niveaux élevés de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau de souris expérimentalement infectées (Mallucci et al, 2003). De plus, les souris KO PrP<sup>C</sup> ne développent aucun signe de neurodégénérescence malgré l'inoculation de fortes doses de PrP<sup>Sc</sup> (Fischer et al, 1996, Mallucci et al, 2003, Weissmann et al, 1998, Weissmann & Flechsig, 2003). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la neurotoxicité observée dans les ESTs. Par exemple, la neurotoxicité serait due à une perte de fonction de PrP<sup>C</sup> et à la formation et l'accumulation de certaines formes mal repliées et toxiques de PrP<sup>C</sup>.

### 2.3. Mécanismes de neurotoxicité

Malgré les intenses recherches dans le domaine des prions, les mécanismes de neurotoxicité sont encore très peu caractérisés. Plusieurs groupes ont montré que la neurodégénérescence liée aux ESTs est dépendante de l'expression de PrP<sup>C</sup> à la membrane plasmique (Aguzzi, 2005, Brandner et al, 1996, Chesebro et al, 2005, Fischer et al, 1996, Harris & True, 2006, Mallucci et al, 2003). Les études suggèrent que la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> et l'accumulation des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> occasionnerait une perte et/ou une subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup> et un gain fonctionnel des formes toxiques de PrP<sup>Sc</sup> (Chiesa & Harris, 2001, Schneider et al, 2011, Solomon et al,

2010, Westergard et al, 2007). Ces différents mécanismes augmenteraient la susceptibilité des neurones à la neurodégénérescence (Figure 8). Les hypothèses de la subversion des fonctions physiologiques et du gain fonctionnel des formes toxiques de PrP<sup>C</sup> sont supportées par les études des souris KO PrP<sup>C</sup> démontrant aucun signe de neurodégénérescence sévère et leurs résistances au PrP<sup>Sc</sup>.



**Figure 8 : Modèle des trois mécanismes possibles de neurotoxicité dans les ESTs**

Trois mécanismes de neurotoxicité ont été proposés afin d'expliquer la neurodégénérescence liée aux ESTs. **A.** Toxicité par des espèces intermédiaires de conversion. La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induirait la formation d'espèces intermédiaires et mal repliées de PrP<sup>C</sup>. Ces espèces intermédiaires favoriseraient des cascades signalétiques toxiques augmentant la susceptibilité des neurones à la mort cellulaire. **B.** Toxicité due à une perte de fonction. La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induit une perte des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup> dont son rôle neuroprotecteur augmentant ainsi la susceptibilité des neurones à la neurodégénérescence. **C.** Toxicité due à une subversion des fonctions de PrP<sup>C</sup>. La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induirait aussi une subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup> c'est-à-dire une dérégulation des voies signalétiques induites par PrP<sup>C</sup>. Cette subversion des fonctions de PrP<sup>C</sup> contribuerait aussi à la neurodégénérescence. (Adapté de Westergard et al., BBA Molecular Basis of Disease, 2007).

### 2.3.1. Perte et subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup>

Il a été démontré que PrP<sup>C</sup> favorise la survie cellulaire par différents mécanismes et que ces mêmes mécanismes sont affectés lors de la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> ce qui augmente la susceptibilité des cellules à la mort cellulaire. Par exemple, PrP<sup>C</sup> est connu pour inhiber l'activité de la protéine Bax, un facteur pro-apoptotique, favorisant ainsi la survie cellulaire (Lin et al, 2008a, Roucou et al, 2005). Il a été démontré que PrP<sup>C</sup> peut se

localiser dans le cytoplasme dû à sa non translocation au RE et interagit avec Bax (Lin et al, 2008a, Roucou et al, 2005). Cette interaction inhibe le changement conformationnel de Bax vers sa forme active et favorise la survie cellulaire. De plus, il a été démontré que plusieurs mutants familiaux perdent non seulement l'activité anti-Bax de PrP<sup>C</sup> mais en plus, ils inhibent l'activité anti-Bax de PrP<sup>C</sup> endogène ou exogène confirmant leurs caractères dominant négatif (Jodoin et al, 2007, Jodoin et al, 2009, Laroche-Pierre et al, 2009, Lin et al, 2008a). Cette perte de fonction de PrP<sup>C</sup> augmente la susceptibilité des cellules aux différents stress cellulaire et à la mort cellulaire.

Récemment, il a été démontré que PrP<sup>C</sup> par son interaction avec les sous-unités GluA1 et GluA2 du récepteur AMPA augmente l'acquisition du Zn<sup>2+</sup> (Watt et al, 2012). Les auteurs ont aussi montré que l'expression des mutants familiaux et l'infection par PrP<sup>Sc</sup> diminue l'acquisition du Zn<sup>2+</sup> ce qui affecte l'activité de certaines protéines sensibles au Zn<sup>2+</sup> comme la tyrosine phosphatase intracellulaire. Cette dérégulation de l'homéostasie du Zn<sup>2+</sup> contribuerait au processus de neurodégénérescence (Watt & Hooper, 2003, Watt et al, 2012). D'autres groupes ont démontré que l'homéostasie d'autres métaux tels que le Cu<sup>2+</sup> (Bolea et al, 2010, Canello et al, 2012, Johnson et al, 2013, Mitteregger et al, 2009, Rachidi et al, 2003, Varela-Nallar et al, 2006a, Wu et al, 2010), le Fe<sup>2+</sup> (Bhupanapadu Sunkesula et al, 2010, Singh et al, 2009a, Singh et al, 2009c, Singh et al, 2012, Singh et al, 2010) et Mn<sup>2+</sup> (Bolea et al, 2010, Hortells et al, 2010, Johnson et al, 2013, Lehmann, 2002, Mitteregger et al, 2009) est également affectée dans les ESTs. Les différentes études suggèrent que cette dérégulation de l'homéostasie des métaux engendre un stress oxydatif augmentant ainsi la susceptibilité des neurones à la neurodégénérescence (Bhupanapadu Sunkesula et al, 2010, Hortells et al, 2010, Lehmann, 2002, Singh et al, 2009a, Singh et al, 2009c, Singh et al, 2012, Singh et al, 2010, Turnbull et al, 2003, Wong et al, 2001). Cette hypothèse est supportée par le haut niveau de stress oxydatif observé dans les ESTs qui se caractérise par un taux d'oxydation des lipides et des protéines plus élevé (Pamplona et al, 2008, Petersen et al, 2005).

Une autre équipe (Rambold et al, 2008) a démontré pour la première fois que PrP<sup>Sc</sup> inhibe non seulement l'activité neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup> mais en plus, PrP<sup>Sc</sup> induit l'activation de certaines cascades signalétiques reliées à PrP<sup>C</sup> augmentant la susceptibilité des neurones aux stress cellulaires (Rambold et al, 2008). Cette étude suggère que PrP<sup>Sc</sup> altère la conformation du domaine hydrophobe connu pour être crucial pour la fonction neuroprotectrice de PrP<sup>C</sup>. De plus, par son interaction avec PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup> induit une suractivation des voies signalétiques JNK. Cette surstimulation de la voie JNK augmente la susceptibilité des cellules infectées à l'apoptose (Rambold et al, 2008) lors de stress cellulaires tels que le stress oxydatif et thermique.

Enfin, il a été démontré que d'autres voies signalétiques induites normalement par PrP<sup>C</sup> sont altérées dans les ESTs. Par exemple, l'activation de la voie NCAM-Fyn-ERK est surstimulée dans les cellules infectées chroniquement et expérimentalement avec PrP<sup>Sc</sup> (Didonna & Legname, 2010, Didonna, 2013, Gyllberg et al, 2006, Nixon, 2005). Les études ont suggéré que PrP<sup>Sc</sup> dû à sa localisation aux radeaux lipidiques (Lewis & Hooper, 2011) et à son interaction avec NCAM, favorise la translocation de NCAM aux radeaux lipidiques. Ainsi, PrP<sup>Sc</sup> suractiverait la voie Fyn/ERK (Didonna & Legname, 2010, Didonna, 2013, Gyllberg et al, 2006, Nixon, 2005). La surstimulation des kinases ERK a été confirmée dans plusieurs modèles d'études de neurotoxicité (Carimalo et al, 2005, Didonna & Legname, 2010, Didonna, 2013, Lee et al, 2005, Marella et al, 2005, Thellung et al, 2007). Pietri et al. (Pietri et al, 2006) ont démontré que la suractivation des kinases ERK augmente la production cellulaire de ROS contribuant ainsi aux stress cellulaires et à la susceptibilité des neurones à la mort cellulaire. En plus des kinases ERK, la voie signalétique PI3K-Akt induite par PrP<sup>C</sup> contribue normalement à son rôle de neuroprotecteur, mais elle est altérée lors d'infection par PrP<sup>Sc</sup>. Cette dérégulation augmente aussi la susceptibilité des neurones aux différents stress cellulaires (Didonna, 2013, Roffe et al, 2010, Seo et al, 2010, Simon et al, 2013). Ces différentes études démontrent bien que la perte et la subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup> contribueraient à la neurodégénérescence observée dans les ESTs.

### 2.3.2. Gain fonctionnel des espèces toxiques de PrP<sup>C</sup>

Afin d'étudier les espèces toxiques de PrP<sup>C</sup>, plusieurs modèles artificiels et physiologiques ont été développés et caractérisés. Ces modèles permettent de mieux comprendre les mécanismes possibles de neurotoxicité reliés aux ESTs.

#### 2.3.2.1. Perturbation de l'intégrité des membranes lipidiques

De nombreuses études ont démontré que PrP<sup>C</sup> peut se retrouver sous plusieurs formes neurotoxiques mais non infectieuses, comme des dimères (Yang et al, 2013), des oligomères (Chich et al, 2010, Demuro et al, 2005, Huang et al, 2013, Kristiansen et al, 2007, Polyakova et al, 2009, Resenberger et al, 2011, Rezaei et al, 2005, Wu et al, 2010), des agrégats (Biasini et al, 2008, Chiesa et al, 2008, Das et al, 2010, Macedo et al, 2012, Polano et al, 2009, Sanghera et al, 2008, Shiraishi et al, 2009, Thellung et al, Vasan et al, 2006), et des fibres amyloïdes (Bucciantini et al, 2012, Demuro et al, 2005, Hafner-Bratkovic et al, 2012, Lee et al, 2011, Novitskaya et al, 2006). Ces différentes espèces affectent l'homéostasie cellulaire et favorise la mort neuronales par plusieurs mécanismes. Par exemple, les différentes espèces de PrP<sup>C</sup> pourrait interagir avec les membranes lipidiques et pourrait déstabiliser l'intégrité de la membrane plasmique. (Chich et al, 2010, Chiesa & Harris, 2001, Farrelly et al, 2003, Gu et al, 2002, Kourie & Henry, 2001, Kourie, 2002, Kourie et al, 2003, Magzoub et al, 2006, Rymer & Good, 2000, Sanghera et al, 2008, Thellung et al, 2000). Ces résultats ont été confirmés avec un autre modèle d'agrégation de PrP<sup>C</sup> soit celui du peptide 106-126 (Belosi et al, 2004, Ettaiche et al, 2000, Florio et al, 2003, Gong et al, 2007, Gu et al, 2002, Jobling et al, 2001, McHattie et al, 1999, Rymer & Good, 2000, Singh et al, 2002, Walsh et al, 2009, Walsh et al, 2010). Ce peptide a le potentiel de fibrogénèse et d'agrégation de PrP<sup>Sc</sup> mais contrairement à PrP<sup>Sc</sup>, il est neurotoxique mais non infectieux.

De plus, certains mutants de délétion de PrP<sup>C</sup> (Figure 4) dont le PrP $\Delta$ HD (PrP $\Delta$ 105-125) induisent une neurotoxicité accrue et une neurodégénérescence spontanée et rapide

(Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2013, Christensen et al, 2010, Harris, 2003, Massignan et al, Rane et al, 2010, Solomon et al, 2012, Solomon et al, Westergard et al). Il a été suggéré que le mutant PrP<sup>Δ</sup>H<sup>D</sup> induit la formation d'une forme transmembranaire et d'un pore dans la membrane plasmique dérégulant l'homéostasie ionique et augmentant ainsi la susceptibilité des cellules à la mort cellulaire (Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2010, Biasini et al, 2013, Christensen et al, 2010, Harris, 2003, Massignan et al, Rane et al, 2010, Solomon et al, 2012, Solomon et al, Westergard et al). Cependant, contrairement aux ESTs, leurs effets neurotoxiques sont inhibés lors de l'expression de PrP<sup>C</sup> et la pathologie induite par l'expression de ces mutants n'est pas transmissible.

L'implication des agrégats de PrP<sup>C</sup> et de la déstabilisation des membranes lipidiques a été étudié à l'aide d'un modèle plus physiologique, soit l'expression de certains mutants familiaux (Harris, 2003, Lehmann & Harris, 1996a, Lehmann & Harris, 1996b, Priola & Chesebro, 1998). La mutation PG14 est un modèle souvent étudié et correspond à l'insertion de neuf octapeptides associés à une EST familiale humaine. Cette mutation induit un changement conformationnel au niveau de leur domaine hydrophobe qui est important pour leur agrégation et leur rétention intracellulaire (Biasini et al, 2010). Les souris transgéniques exprimant ce mutant familial développent une neurodégénérescence spontanée et un dépôt de PrP (Chiesa et al, 1998, Chiesa et al, 2000, Chiesa et al, 2003, Harris et al, 2000, Harris et al, 2003, Medrano et al, 2008). Les molécules les plus neurotoxiques de PG14 sont des petits agrégats riches en feuillet  $\beta$  (Chiesa et al, 2003). Ces agrégats inhibent le transport axonal (Medrano et al, 2008) ce qui affecte divers processus cellulaires. En plus, ces différentes caractéristiques, c'est-à-dire la formation d'agrégats et le changement conformationnel du domaine hydrophobe de PrP<sup>C</sup>, suggèrent que ce mutant perturbe la membrane lipidique comme les agrégats de PrP<sup>C</sup> ou les mutants de délétion de PrP<sup>C</sup>. Cependant, aucune évidence *in vivo* nous montre la formation de pores membranaires lors d'ESTs ce qui diminue la validité de cette hypothèse.

### 2.3.2.2. Le stress au RE

Le RE est un organe impliqué dans la synthèse des lipides, dans le bon repliement et la maturation des protéines. Un stress au RE se traduit par l'altération d'une des fonctions du RE. L'accumulation des formes mal repliées des protéines dans le RE et la saturation du système de maturation/sécrétion des protéines sont connues pour induire un stress au RE. Certains mutants familiaux induisent un changement topologique de PrP<sup>C</sup>, qui adopte une forme transmembranaire nommée PrP<sup>Ctm</sup> (Harris, 2003). La formation de PrP<sup>Ctm</sup> se produit au niveau du RE et se traduit par l'insertion du domaine hydrophobe de PrP<sup>C</sup> au niveau de la membrane afin que son domaine N-terminal se situe vers le cytosol tandis que son domaine C-terminal se retrouve dans la lumière du RE (Aguzzi & Steele, 2009, Chakrabarti et al, 2009, Harris, 2003, Rane et al, 2010, Stewart et al, 2005). Ces différentes mutations se localisent dans la région hydrophobe et les régions adjacentes contenant plusieurs acides aminés chargés positivement (Aguzzi & Steele, 2009, Chakrabarti et al, 2009, Harris, 2003, Rane et al, 2010), ainsi qu'au niveau du signal peptide C-terminal (Gu et al, 2008). PrP<sup>Ctm</sup> se localise à la membrane plasmique mais s'accumule majoritairement au niveau du RE et du Golgi (Biasini et al, 2010, Stewart et al, 2001, Stewart & Harris, 2003, Stewart & Harris, 2005). L'accumulation de PrP<sup>Ctm</sup> dans le RE induit un stress au RE (Nunziante et al, 2011, Shi & Dong, 2011, Torres et al, 2010, Torres et al, Wang et al, 2012b, Wang et al, 2011), comme observé récemment dans un modèle expérimental d'infection au PrP<sup>Sc</sup> (Moreno et al, 2012). De plus, d'autres mutations familiales sont connues pour affecter le routage de PrP<sup>C</sup> en favorisant son accumulation dans l'appareil de sécrétion en particulier le RE. Par exemple, le mutant PG14 s'accumule dans le RE et induit potentiellement un stress au RE. Certaines études suggèrent que le stress au RE contribuerait à la formation de PrP<sup>Ctm</sup> et au processus de neurotoxicité (Hetz et al, 2003, Nunziante et al, 2011, Quaglio et al, 2011, Rane et al, 2008, Shi & Dong, 2011, Torres et al, 2010, Wang et al, 2012b, Wang et al, 2011, Xu et al, 2011).

Il a été également démontré que le stress au RE induit non seulement l'accumulation de PrP<sup>C</sup> ou des mutants au niveau du RE mais favoriserait également la localisation cytoplasmique de PrP (Hetz & Soto, 2006, Miesbauer et al, 2010, Nunziante et al, 2011,

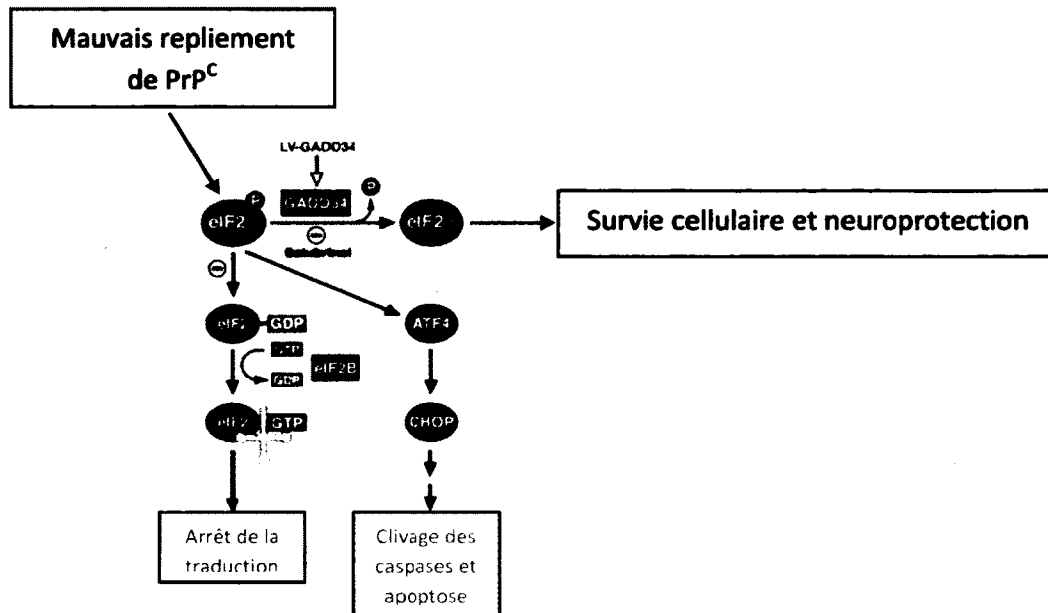
Orsi et al, 2006, Rane et al, 2008, Shi & Dong, 2011, Soto, 2008) puisque le stress au RE diminue l'efficacité de la translocation de PrP<sup>C</sup> au RE (Hetz & Soto, 2006, Miesbauer et al, 2010, Nunziante et al, 2011, Orsi et al, 2006, Rane et al, 2008, Shi & Dong, 2011, Soto, 2008). D'autres mutations familiales sont aussi connus pour affecter le routage de PrP<sup>C</sup> en favorisant son accumulation dans le cytoplasme (Gu et al, 2007, Kristiansen et al, 2005, Ma et al, 2002, Mishra et al, 2003). Cette accumulation cytoplasmique se traduit par la formation d'agrégats cytoplasmiques aussi nommés agrésomes (Bence et al, 2001, Beranger et al, 2002, Biasini et al, 2010, Crozet et al, 2008, Kristiansen et al, 2005, Kristiansen et al, 2007, Ma & Lindquist, 2001, Mishra et al, 2003). PrP<sup>Sc</sup> a aussi la capacité de s'accumuler dans le cytoplasme et de former des agrésomes (Cohen & Taraboulos, 2003, Dron et al, 2009, Kristiansen et al, 2005, Ma & Lindquist, 2002, Yamasaki et al, 2012). Il a été démontré in vivo que l'accumulation de PrP<sup>C</sup> dans le cytoplasme est neurotoxique puisque les souris transgéniques exprimant un mutant cytoplasmique artificiel de PrP<sup>C</sup> nommé CyPrP, développent une neurodégénérescence spontanée et rapide (Ma & Lindquist, 2001, Ma et al, 2002). CyPrP possède certaines propriétés communes à PrP<sup>Sc</sup> telles que son potentiel agrégatif et sa résistance à la protéinase K, mais pas son potentiel infectieux (Norstrom et al, 2007, Weissmann & Flechsig, 2003). Certaines formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> inhibent également l'activité du protéasome qui est responsable de la dégradation cytosolique des protéines (Crozet et al, 2008, Deriziotis et al, 2011, Kristiansen et al, 2007). Cette inhibition du protéasome contribuerait en elle-même au stress cellulaire mais aussi à l'accumulation de PrP<sup>C</sup> au cytoplasme.

### **2.3.2.3. La réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$ dépendante**

Il est clairement établi que l'accumulation cytoplasmique augmente la susceptibilité des cellules aux stress cellulaires et conséquemment à la mort cellulaire (Chakrabarti & Hegde, 2009, Chakrabarti et al, 2011, Kristiansen et al, 2005, Li et al, 2011a, Ma et al, 2002, Ma et al, 2002, Rambold et al, 2006, Rane et al, 2008, Wang et al, 2006, Wang et al, 2009). Nous avons démontré précédemment que l'expression de CyPrP induit un stress cellulaire eIF2 $\alpha$  dépendante, mais inhibent la formation des GSs (Goggin et al, 2008). Cette



dérégulation de la réponse au stress eiF2 $\alpha$  dépendante contribue au processus de neurodégénérescence. Par la suite, plusieurs études ont démontré que la réponse au stress cellulaire eiF2 $\alpha$  dépendante est activée dans les ESTs et est responsable de la neurodégénérescence (Goggin et al, 2008, Paquet et al, 2009, Roffe et al, 2010). Récemment, Moreno et al ont démontré *in vivo* que la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induit la réponse au stress eiF2 $\alpha$  dépendante (Moreno et al, 2012). L'inhibition de cette voie signalétique rétablit *in vivo* l'excitabilité neuronale, la survie neuronale et augmente le taux de survie des souris infectées. Cependant, une surstimulation de cette voie signalétique accélère grandement la neurodégénérescence et la mort des souris infectées (Moreno et al, 2012). Ceci démontre bien l'importance de la réponse au stress eiF2 $\alpha$  et du stress cellulaire dans les ESTs. (Figure 9).



**Figure 9 : La réponse au stress eIF2 $\alpha$  et le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup>**

La conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> induit la formation de forme mal repliée et toxique de PrP<sup>C</sup>. Ces formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> induisent la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante se traduisant par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , l'arrêt de la synthèse protéique, une défaillance dans l'excitabilité neuronale et finalement la mort neuronale (activation des caspases et induction de l'apoptose). La réactivation de la synthèse protéique (-) et/ou la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (LV-GADD34) rétablie l'excitabilité neuronale et favorise la survie. Cependant, l'inhibition de la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Salubrinal) augmente et accélère la neurodégénérescence et diminue le temps de survie. (Adapté de Moreno et al., Nature, 2013).

#### 2.3.2.4. Altération de la voie endolysosomale

PrP<sup>Ctm</sup> et CyPrP interagissent via son domaine N-terminal avec la protéine mahogunin (Aguzzi & Steele, 2009, Chakrabarti & Hegde, 2009). Mahogunin est une ubiquitine ligase essentielle pour la maturation des MVBs. Cette interaction de PrP<sup>Ctm</sup> et CyPrP avec Mahogunin inhibe la maturation des endosomes en MVBs et est responsable de la mort neuronale et de la vacuolisation observées dans les ESTs (Aguzzi & Steele, 2009, Chakrabarti & Hegde, 2009). Ces résultats sont supportés par plusieurs études qui ont confirmé que la voie endolysosomale est affectée dans plusieurs types d'ESTs (Arnold et al, 1995, Ashok & Hegde, 2009, Biasini et al, 2010, Ermolayev et al, 2009, Ersdal et al, 2009, Filimonenko et al, 2007, Gawinecka et al, 2012, Kovacs et al, 2007, Massignan et al, 2010,

Zafar et al, 2011). Par exemple, l'activité de certaines protéines Rabs est affectée par certains mutants de PrP<sup>C</sup> induisant ainsi une dérégulation du système endolysosomal (Gawinecka et al, 2012, Massignan et al, 2010, Zafar et al, 2011). Cette dérégulation de la voie endolysosomale se caractérise par l'accumulation des endosomes précoces, une diminution des MVBs, et un changement morphologique des lysosomes. Il a été démontré récemment que lors d'infection par PrP<sup>Sc</sup>, la formation des exosomes et la régulation du système d'ARNi est affectée, ce qui se traduit par des signatures spécifiques de microARN (miARN) dans les cellules infectées ou se localisant dans leurs exosomes, et par la formation d'exosomes non matures (Bellingham et al, 2012, Gibbings et al, 2010, Lukiw et al, 2011, Provost, 2010, Saba et al, 2008). Ceci confirme que le système endolysosomal est altéré dans les ESTs.

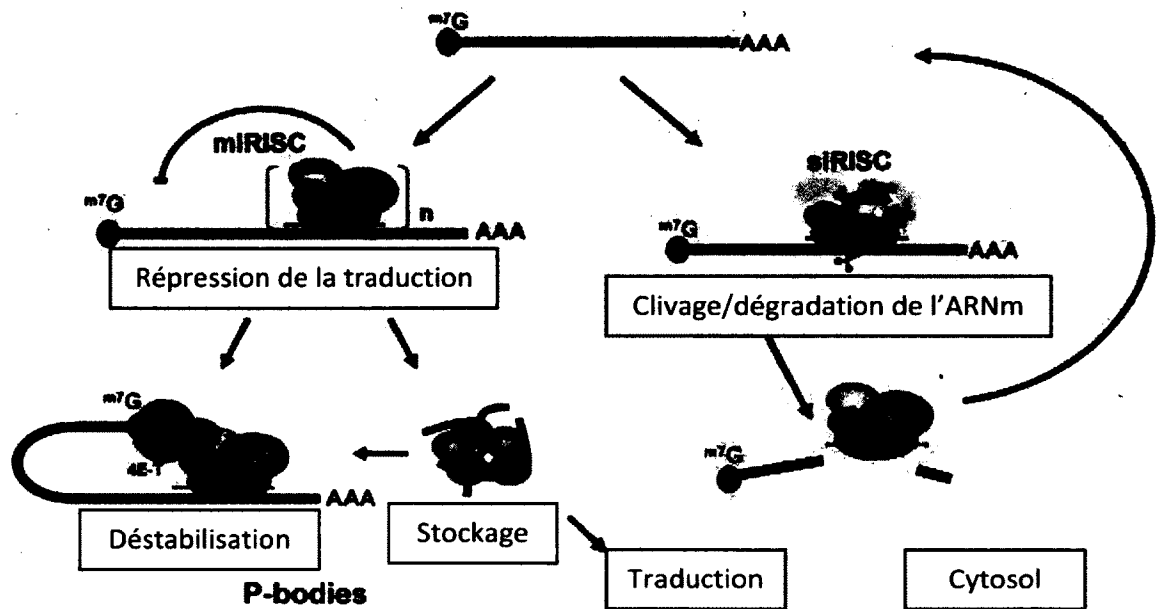
En résumé, les études suggèrent que PrP<sup>Sc</sup> et les mutations familiales de PrP<sup>C</sup> induisent un changement conformationnel, topologique et/ou de routage cellulaire de PrP<sup>C</sup> qui est responsable de la perte ou la subversion des fonctions de PrP<sup>C</sup> et/ou du gain fonctionnel des formes toxiques et mal repliées de PrP<sup>C</sup>.

### **3. La régulation de la traduction des ARNm par le système d'ARN interférents (ARNi)**

#### **3.1. Description du système ARNi**

Le système d'ARN interférence (ARNi) comprend deux types de petits ARN non codant d'environ 22 nucléotides et sont nommés micro-ARN (miARN) et petits ARN interférents (siARN) (Figure 10). Les ARNi sont très bien conservés au niveau des organismes eucaryotes et sont vitaux (Kren et al, 2009, Lee et al, 2007, Molnar et al, 2007, Tanzer & Stadler, 2004). Le génome humain encode plus de 1000 ARNi régulant environ 60% des gènes (Bentwich et al, 2005, Bentwich, 2005, Farh et al, 2005, Friedman et al, 2009, Lewis et al, 2005). Les ARNi régulent l'expression génique par deux mécanismes généraux distincts soit en régulant la traduction et/ou la dégradation des ARNm cibles ou en induisant un remodelage de la chromatine par la modification des histones et de la méthylation de l'ADN (Ambros & Chen, 2007, Chen & Rajewsky, 2007, Hawkins & Morris,

2008, Tan et al, 2009a, Tan et al, 2009b). Les ARNi régulent majoritairement l'expression génique de façon négative, cependant quelques exemples d'ARNi sont connus pour augmenter l'expression de certaines cibles (Guo et al, 2010, Kedde et al, 2007, Kren et al, 2009, Orom et al, 2008, Vasudevan & Steitz, 2007, Vasudevan et al, 2007). Afin d'acquies ces fonctions régulatrices, les ARNi doivent s'associer avec un complexe multiprotéique nommée *RNA-induced silencing complex* (RISC). Ce complexe protéique est composé des protéines responsables de l'activité ARNi et de sa régulation (Carthew & Sontheimer, 2009, Gregory et al, 2006, Krol et al, 2004, Lages et al, 2012, Rana, 2007, Valencia-Sanchez et al, 2006) (Figure 10). Les Argonautes (Ago) sont les protéines centrales du RISC et sont essentielles à l'activité ARNi. La protéine GW182 est un partenaire d'interaction des protéines Ago et elle est essentielle pour une activité optimale du complexe RISC, donc pour l'activité ARNi. Un des rôles des ARNi est de diriger et favoriser l'association du RISC au niveau de leurs cibles afin d'induire par exemple, la dégradation ou la répression de la traduction des ARNm cibles (Behm-Ansmant et al, 2006, Chekulaeva & Filipowicz, 2009, Chekulaeva et al, 2009, Pillai et al, 2004, Pratt & MacRae, 2009, Rehwinkel et al, 2005).



**Figure 10 : Résumé du système d'ARNi**

*Le système d'ARN interférence (ARNi) comprend deux types de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides et sont nommés micro-ARN (miARN, gauche) et petits ARN interférents (siARN, droite). Les ARNi sont pris en charge par un complexe RISC soit le miRISC pour les miARN et le siRISC pour la siARN. Les RISC se différencient par leur composition puisque seulement l'Ago2 possède l'activité d'endonucléase responsable de l'activité siARN. De plus, l'activité des siRISC semble être indépendante de sa localisation aux P-Bodies contrairement au miRISC (Adapté de Chu and Rana, PLOS Biology, 2006)*

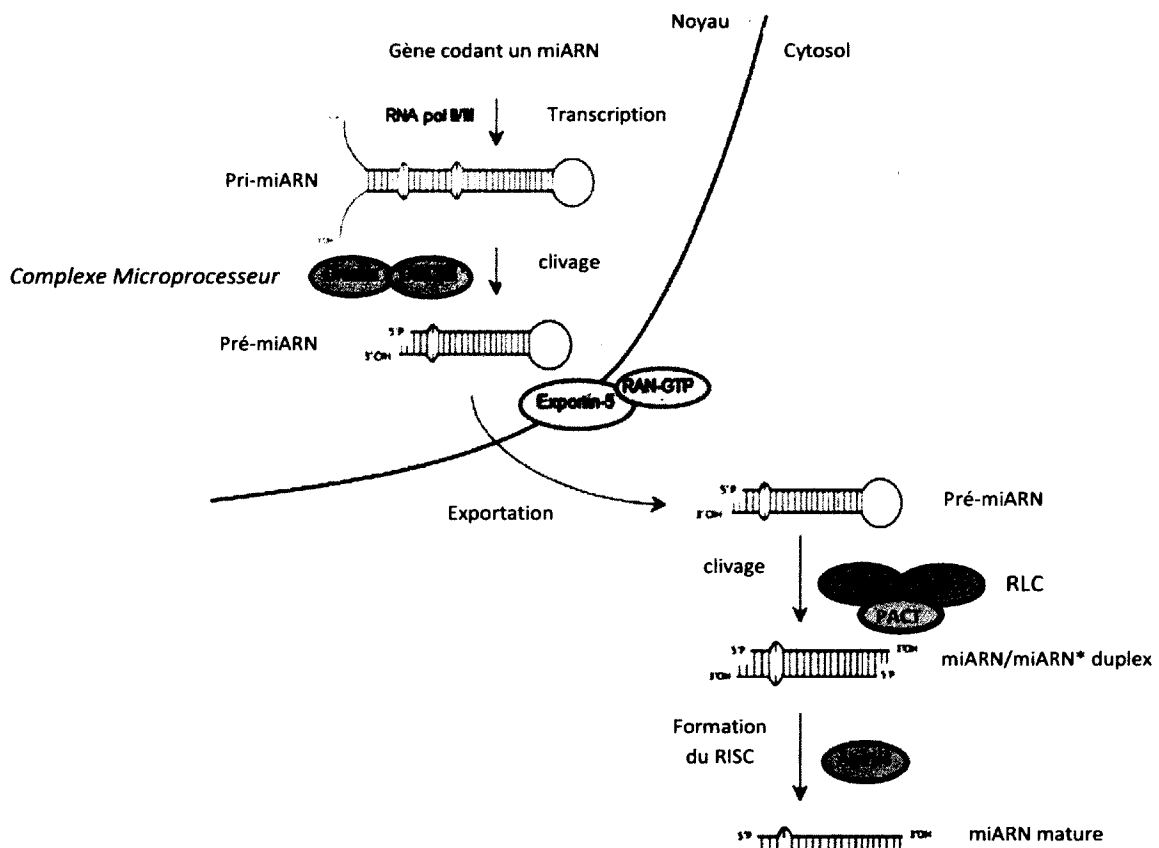
Chez les mammifères, les miARN et siARN se différencient par leur degré de complémentarité avec leur ARNm cibles, leur mode d'activité et de biogénèse (Bartel, 2004, Lages et al, 2012, Valencia-Sanchez et al, 2006, Watanabe et al, 2008). Les siARN ont une complémentarité parfaite avec leurs ARNm cibles induisant ainsi leur clivage via l'activité endonucléase de la protéine Ago2 (Figure 10). Ce clivage de l'ARNm produit deux fragments d'ARN qui vont être rapidement dégradés par deux mécanismes généraux de dégradation des ARNm soit une dégradation 5'-3' dépendante des enzymes de décoiffage

(*decapping*) et une dégradation 3'-5' dépendante du complexe multiprotéique nommé exosome (Orban & Izaurralde, 2005, Valencia-Sanchez et al, 2006). Les miARN ont une complémentarité imparfaite avec leurs ARNm cibles, et ils induisent plutôt l'arrêt de la traduction, la stabilisation et/ou la dégradation des ARNm cibles selon les conditions cellulaires (Figure 10) (Bartel, 2004, Lages et al, 2012, Valencia-Sanchez et al, 2006, Watanabe et al, 2008). La spécificité des miARN pour leur ARNm cibles dépend d'une région d'appariement de 6-8 nucléotides en 5' du miARN (Doench & Sharp, 2004, Lages et al, 2012, Lewis et al, 2003, Lewis et al, 2005, Maziere & Enright, 2007, Valencia-Sanchez et al, 2006). De plus, contrairement aux siARN, l'activité des miARN ne dépend pas seulement d'Ago2 mais aussi des autres membres de la famille des Ago (Ago 1-4). Les protéines Ago ont toutes la capacité de réguler l'expression génique. Par exemple, certaines études ont démontré que lors de l'inhibition de l'expression d'une des protéines Ago, la perte d'activité miARN observée peut être rétablie par l'expression des autres protéines Ago, ce qui suggère qu'elles possèdent des activités redondantes (Lages et al, 2012, Valencia-Sanchez et al, 2006, Watanabe et al, 2008). Les siARN se différencient aussi des miARN par leurs modes de biogénèse qui est expliqué dans le paragraphe suivant.

### **3.2. Biogénèse des ARN interférents**

Les ARNi sont transcrit à partir de gènes ou de séquences introniques d'ARNm. La majorité des gènes d'ARNi caractérisés se localise dans les régions intergéniques ou dans l'orientation antisens d'un gène voisin et sont transcrits comme des entités indépendantes (Lages et al, 2012, Lagos-Quintana et al, 2001, Lee & Ambros, 2001, Lee et al, 2004). Les gènes des ARNi sont soit monocistroniques ou polycistroniques (Altuvia et al, 2005, Lee et al, 2004). La plupart des gènes codant les ARNi sont transcrits par l'ARN polymérase II produisant ainsi le pro-précurseur des ARNi appelés pri-ARNi. Les pri-ARNi étant transcrits par l'ARN polymérase II possèdent donc une structure coiffe en 5' et une queue poly A en 3' comme les ARNm (Cai et al, 2004, Lages et al, 2012, Lee et al, 2004, Zhou et al, 2007). Cependant, les pri-ARNi sont caractérisés par la formation d'une

structure tige-boucle avec des régions 5' et 3' flanquantes non appariées (Cai et al, 2004, Lages et al, 2012, Lee et al, 2004). Cette structure tige-boucle des pri-ARNi est essentielle pour les différentes étapes de la maturation. Par exemple, la longue structure tige-boucle des pri-siARN est reconnue et clivée par Dicer afin de produire plusieurs siARN (Lages et al, 2012, Murchison & Hannon, 2004). Tandis que les structures tige-boucles des pri-miARN sont essentielles pour toutes les étapes de maturation des miARN (Starega-Roslan et al, 2011). Les pri-miARN sont maturés par diverses voies discutées dans les sections suivantes (Figure 11).



**Figure 11 : Modèle de la voie canonique de la maturation des miARN**

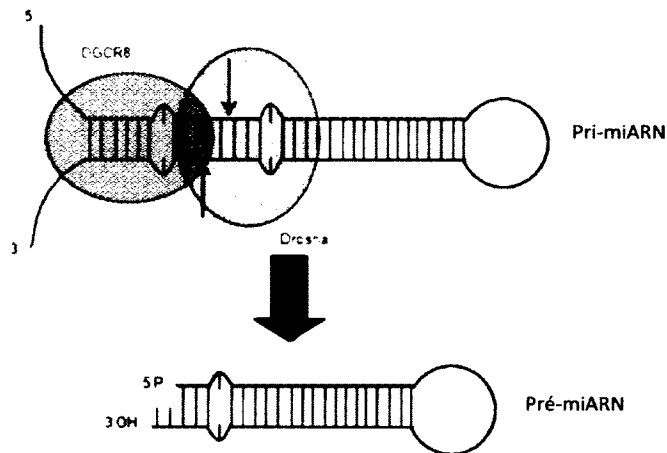
La majorité des gènes codant les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II et/ou provient d'introns excisés lors du processus d'épissage des ARNm. Ces précurseurs sont nommés pri-miARN et sont clivés par un complexe protéique composé de Drosha et DGCR8. Ce clivage génère un autre précurseur nommé pré-miARN. Les pré-miARN sont ensuite exportés au cytoplasme par un mécanisme exportin-5/RAN-GTP dépendant. Au niveau du cytoplasme, les pré-miARN sont pris en charge par le complexe protéique nommé RISC-loading complex (RLC). Le RLC est composé d'un cœur protéique de trois protéines soit Dicer, TRBP et PACT. Dicer est l'endonucléase responsable du clivage des

*pré-miARN en miARN mature. De plus, on retrouve aussi les protéines Ago1/4 associées au RISC permettant ainsi de former le complexe minimal du RISC soit les protéines Ago1/4 chargées du brin guide du miARN (Adapté de : Lages et al., Frontier in Bioscience, 2012).*

### **3.2.1. Voie canonique de biogénèse**

La voie canonique se caractérise par deux étapes de maturation des pri-miARN (Figure 11). Premièrement, les pri-miARN sont pris en charge par un complexe multiprotéique nommé complexe *microprocessor*. Ce complexe est composé de plusieurs protéines dont la protéine Drosha, une endonucléase nucléaire, et DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), un co-activateur essentiel pour l'activité endonucléase de Drosha. Ces deux protéines forment le cœur protéique minimal du complexe microprocesseur. Ce complexe reconnaît la structure ARN double brin de la tige-boucle des pri-ARNi et clive les précurseurs à environ 11 nucléotides de la jonction entre les régions flanquantes et la structure double-brin de l'ARN. Ce clivage du pri-miARN par le complexe *microprocessor* produit une tige-boucle d'environ 80 nucléotides sans les régions flanquantes nommée les pré-ARNi (Gregory et al, 2004, Gregory et al, 2005, Gregory et al, 2006, Han et al, 2006, Lages et al, 2012, Lages et al, 2012, Lee et al, 2003, Lee et al, 2006a, Yeom et al, 2006) (Figure 12).

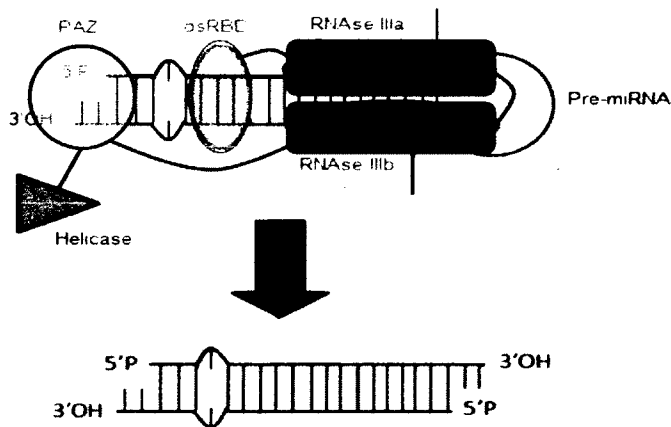




**Figure 12 : Maturation des pri-miARN en pré-miARN par le complexe Drosha/DGCR8**

*Dans le complexe Drosha/DGCR8, la protéine DGCR8 permet de reconnaître et de lier la jonction entre les régions flanquantes et la structure double-brin. Cette liaison du complexe Drosha/DGCR8 au pré-miARN induit l'activité endonucléase de Drosha. Drosha clive asymétriquement le pré-miARN à environ 11 nucléotides de la jonction entre les régions flanquantes et la structure double-brin. (Adapté de Lages et al., Frontier in Bioscience, 2012)*

Les pré-ARNi sont ensuite exportés dans le cytoplasme via un mécanisme exportin-5-RAN-GTP dépendant comme mentionné précédemment (Brownawell & Macara, 2002, Gwizdek et al, 2003, Lages et al, 2012, Lee et al, 2011, Yi et al, 2005) et sont reconnus et clivés spécifiquement par la protéine Dicer, une endonucléase cytoplasmique. Dicer est composé de deux domaines RNase IIIa, un domaine ARN hélicase, un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) et d'un domaine PAZ. Les domaines PAZ et dsRBD de Dicer sont impliqués dans la reconnaissance du pré-miARN alors que les deux domaines RNase IIIa sont responsables de l'activité ribonucléase de Dicer (Figure 13) (Bernstein et al, 2001, Gan et al, 2008, Hutvagner et al, 2001, Ji, 2008, Ketting et al, 2001, Lages et al, 2012, Lund & Dahlberg, 2006, Ma et al, 2004, Song et al, 2003, Zhang et al, 2002, Zhang et al, 2004).

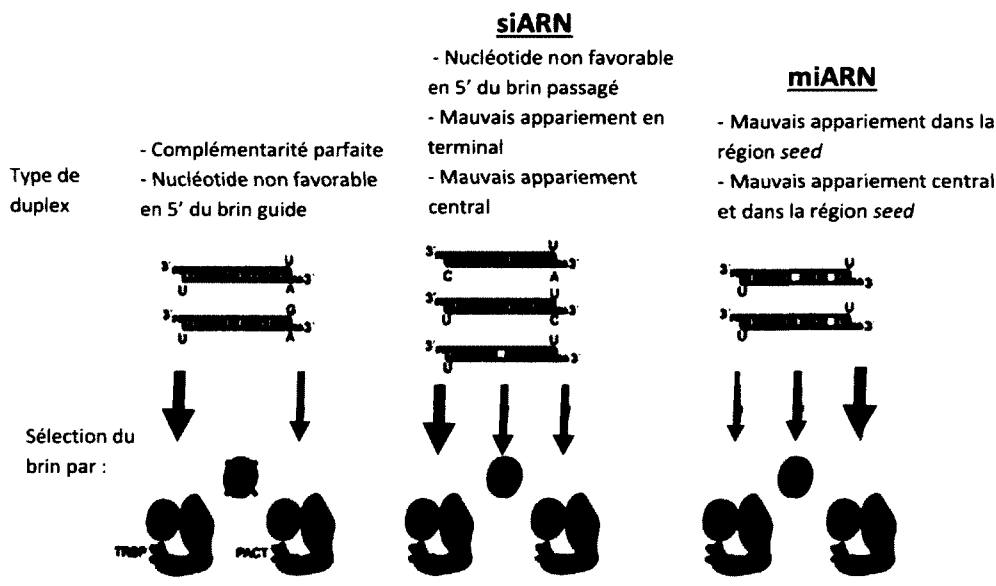


**Figure 13 : Rôle des différents domaines de Dicer dans la maturation des pré-miARN en miARN**

*Dicer est l'endonucléase responsable du clivage des pré-miARN en miARN matures. Elle est constituée d'un domaine PAZ reconnaissant l'extension 3' simple brin du pré-miARN, un domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD) permettant l'orientation des deux domaines RNase au niveau de la tige boucle et ainsi le clivage du pré-miARN en miARN mature. Les domaines RNase A et B possèdent l'activité clivage. (Adapté de : Lages et al., *Frontier in Bioscience* 17, 2012)*

L'activité optimale de Dicer dépend de plusieurs autres partenaires protéiques. Par exemple, Dicer forme un complexe avec les protéines TRBP (HIV-1 TAR RNA-binding protein), PACT (protein activator of PKR) et Ago2. Ce complexe protéique se nomme *RISC loading complex* (RLC) et il est essentiel à l'activité adéquate du système d'ARNi. Ces différents partenaires d'interaction augmentent l'efficacité de la reconnaissance et du clivage des pré-miARN par Dicer favorisant la formation du duplexe d'ARNi d'environ 22 nucléotides de long. Les protéines TRBP et PACT interagissent avec Dicer sous différentes formes soit monomérique, homodimérique ou hétérodimérique. Ces interactions entre Dicer et PACT/TRBP sont particulièrement importantes pour le système ARNi puisqu'ils augmentent l'efficacité de chacune des dernières étapes de la maturation des ARNi et de l'activité des ARNi (Chendrimada et al, 2005, Cosentino et al, 1995, Kok et al, 2007, Koscianska et al, 2011, Lages et al, 2012, Lee et al, 2013, Lee et al, 2006b, MacRae et al, 2008, Noland & Doudna, 2013). Par exemple, le knockout/knockdown de TRBP ou PACT

induisent un défaut de maturation des ARNi, c'est-à-dire une accumulation de certains pré-ARNi et une diminution générale des ARNi matures (Kok et al, 2007, Koscianska et al, 2011, Lages et al, 2012, Lee et al, 2013, Lee et al, 2006b). Les auteurs de ces études suggèrent que PACT, TRBP et les Ago facilitent et stabilisent l'association des pré-ARNi à Dicer favorisant ainsi leur maturation en duplexe d'ARNi (Kok et al, 2007, Koscianska et al, 2011, Lages et al, 2012, Lee et al, 2013, Lee et al, 2006b). De plus, il a été démontré que les protéines PACT et TRBP ont des activités distinctes dans la régulation de Dicer au niveau de la reconnaissance du substrat (Figure 14) (Lages et al, 2012, Lee et al, 2013). Leurs résultats suggèrent que PACT privilégie la voie miARN tandis que TRBP favorise la voie siARN (Lages et al, 2012, Lee et al, 2013). L'interaction entre les Ago et les autres membres du RLC est importante pour la formation du RISC et le *turnover* du RISC.

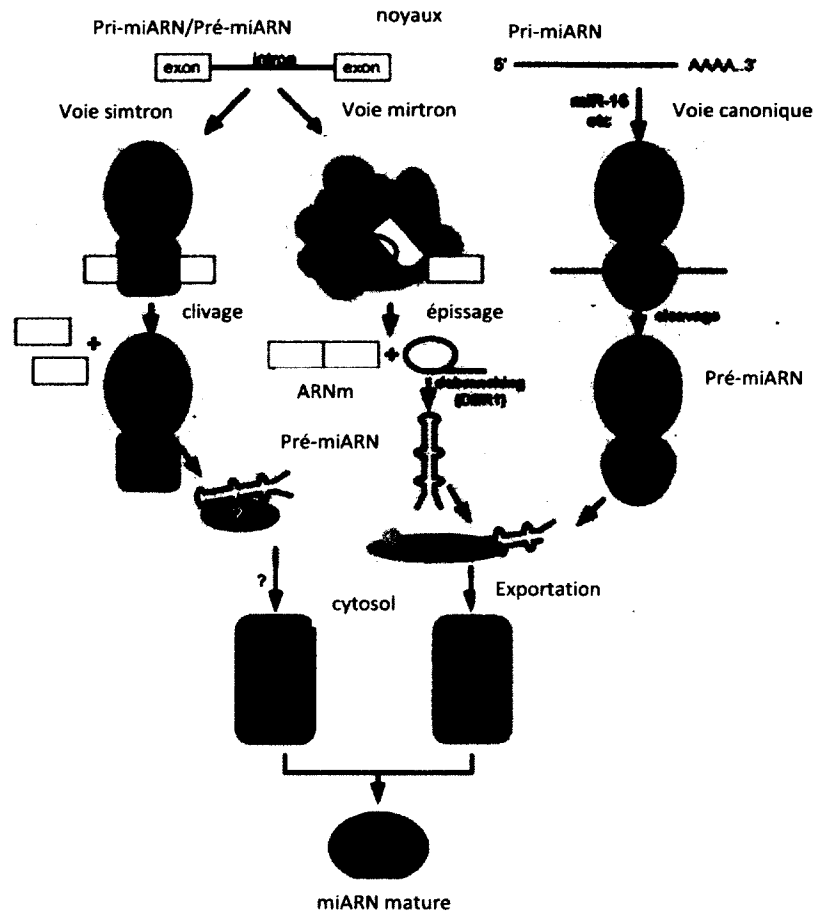


**Figure 14 : Rôle de PACT et TRBP dans la reconnaissance du substrat et la formation du RLC**

*Les protéines TRBP et PACT interagissent différemment avec les différents types de duplexe d'ARNi. TRBP interagit préférentiellement avec les duplexes d'ARNi ayant une complémentarité parfaite (siARN) ou d'un désappariement au niveau de la région centrale. TRBP favorise donc l'activité siARN. Tandis que PACT interagit préférentiellement avec les duplexes d'ARNi ayant un désappariement au niveau de la région seed (miARN). PACT favorise donc l'efficacité des miARN. (Adapté de Noland and Doudna, RNA, 2013)*

### 3.2.2. Voies non classiques de biogénèse

Les ARNi provenant des régions introniques sont produits par des mécanismes non classiques et sont séparés en deux catégories soit les mirtron et les simtron (Havens et al, 2012, Kim & Kim, 2007, Lages et al, 2012, Lin et al, 2008b, Okamura et al, 2007, Ruby et al, 2007). Les mirtron sont produits lors de l'excision de l'intron au sein du pré-ARNm par la machinerie d'épissage nommée spliceosome. Lors de son excision, l'intron comprenant le précurseur de l'ARNi forme une structure appelée intron lariat, qui est reconnue et linéarisée par la protéine DBR1 (Debranching enzyme 1) afin de permettre la formation du pré-miARN. Ces pré-mirtron sont ensuite exportés au cytoplasme par l'exportine 5 et sont maturés par les mêmes protéines cytoplasmiques que la voie canonique (Figure 15). Les simtron sont des ARNi provenant aussi des introns mais, contrairement aux mirtron, ils sont indépendants de l'épissage de la séquence intronique, de Dicer, DGCR8 et de l'exportine 5 mais dépendent de la protéine Drosha. Leur mécanisme de maturation est très peu caractérisé (Figure 15).



**Figure 15 : Modèle des voies canoniques et non canoniques de maturation des miARN**

*Droite: Les miARN canoniques sont d'abord maturés dans le noyau par le complexe protéique Drosha/DGCR8, ensuite exportés dans le cytoplasme par l'exportin5 (XPO5) pour être clivés par la protéine Dicer et être chargés sur les protéines centrales du RISC, les protéines Ago1/4. Centre: Les mirtron sont localisés dans les introns des ARNm et sont produits lors de l'épissage alternatif des ARNm. Les mirtrons forment une structure bien distincte dans les introns appelée lariat intron. Cette structure est reconnue par une debranching enzyme (DBR1) permettant d'exciser le mirtron de l'intron. Le mirtron est ensuite exporté dans le cytoplasme par XPO5, maturé par Dicer et chargé dans le RISC. Gauche: Les simtron proviennent aussi de séquences introniques. Contrairement aux mirtron, la maturation des simtron est indépendante de l'épissage de l'intron, de DGCR8, de XPO5 et de Dicer. Le mécanisme de maturation des précurseurs des simtron est encore inconnu, cependant tout comme les miARN canoniques et les mirtron, les simtron sont chargés sur les protéines Ago1/4 afin de former le RISC. (Adapté de Havens et al., NAR, 2012)*

### 3.3. Formation du RISC

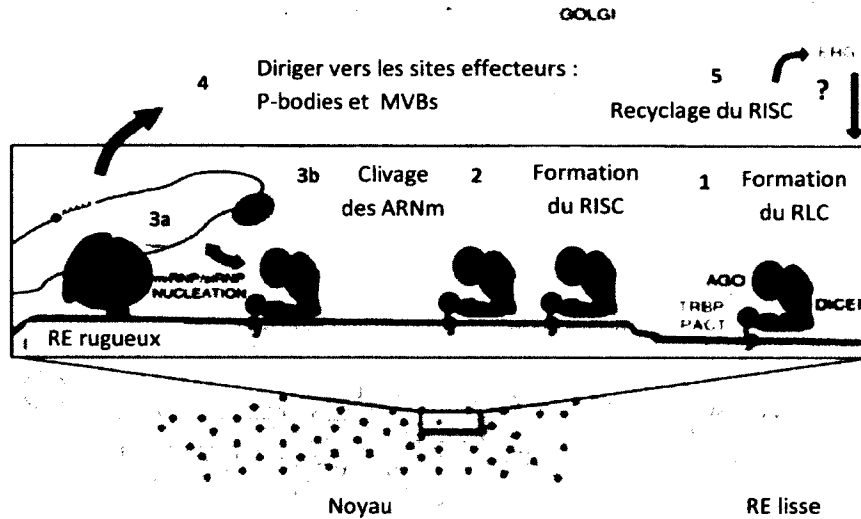
Le RISC mature (Figure 10) est composé d'un cœur protéique, Ago et GW182, et de l'ARNi guide avec l'ARNm cible. Les protéines Ago sont les protéines centrales du RISC et sont essentielles à l'activité ARNi. La première étape de la formation du RISC se produit au sein du complexe RLC, c'est-à-dire qu'après la formation du duplexe d'ARNi, il y a un transfert du duplexe ARNi vers la protéine Ago suivi de l'exclusion et la dégradation du brin non guide (brin passagé) du miARN. Les différentes protéines du RLC (TRBP, PACT et Dicer) sont nécessaires pour le transfert du duplexe d'ARNi vers la protéine Ago et pour le processus de sélection du brin guide du duplexe d'ARNi. Le RLC jouerait le rôle de senseur thermodynamique afin de sélectionner le type de duplexe d'ARNi à charger sur les Ago et pour sélectionner le brin guide (Chendrimada et al, 2005, Kok et al, 2007, Koscianska et al, 2011, Lages et al, 2012, Lee et al, 2013, Lee et al, 2006b, MacRae et al, 2008, Noland & Doudna, 2013). De plus, ce processus de séparation et de dégradation du brin passager du duplexe ARNi dépend de l'activité ARN hélicase d'Ago2 et de son association avec un autre complexe d'endoribonucléase nommé C3PO (Kim et al, 2007b, Kwak & Tomari, 2012, Leuschner et al, 2006, Liu et al, 2009, Matranga et al, 2005, Preall & Sontheimer, 2005, Rand et al, 2005, Ye et al, 2011). La formation du complexe Ago et du brin guide de l'ARNi est l'étape cruciale de l'activité ARNi puisqu'ils sont les composantes minimales pour un RISC actif. Certaines études ont démontré que TRBP et PACT agissent de façon distincte sur le système ARNi, c'est-à-dire que TRBP favoriserait davantage l'activité siARN que miARN alors que PACT avantagerait plus l'activité des miARN (Lages et al, 2012, Lee et al, 2013). Le RISC est composé de plusieurs autres protéines qui sont essentielles pour une activité adéquate et optimale du système ARNi. Par exemple, la protéine GW182 est un partenaire protéique crucial des protéines Ago puisqu'elle augmente l'efficacité et l'activité du RISC actif (Baillat & Shiekhattar, 2009, Chekulaeva et al, 2009, Chekulaeva et al, Chekulaeva et al, Eulalio et al, 2009, Lian et al, 2009, Rehwinkel et al, 2005, Takimoto et al, 2009, Yao et al). D'autres protéines associées au RISC permettent plutôt la régulation de certains types de transcrit. Par exemple, la protéine TTP reconnaît et lie

spécifiquement les motifs AU riches (ARE, AU-rich element) au sein du transcrit et permet le recrutement et l'activité du RISC sur l'ARNm cible (Jing et al, 2005).

### **3.4. Localisation du RISC**

#### **3.4.1. Association du RISC avec la membrane du RE**

Plusieurs études ont démontré que les processus de formation des complexes protéiques RLC et RISC, et des activités qui leurs sont attribuées, sont associés à certaines organites. Par exemple, une étude récente (Stalder et al, 2013) a montré la présence de pré-miARN et de miARN associés à Dicer (RLC) au niveau du RE, suggérant que la maturation de certains pré-miARN par Dicer se produit à la membrane du RE. Les auteurs ont aussi montré que les complexes miRISC et siRISC matures sont associés avec la membrane externe du RE et que l'activité endonucléase du siRISC (Ago2) se produit au niveau de la membrane du RE. Les protéines TRBP et PACT sont responsables de l'association du RLC avec la membrane du RE et sont essentielles pour une activité optimale des ARNi (Figure 16) (Stalder et al, 2013).



**Figure 16 : Modèle de l'organisation spatiale de la formation du RISC**

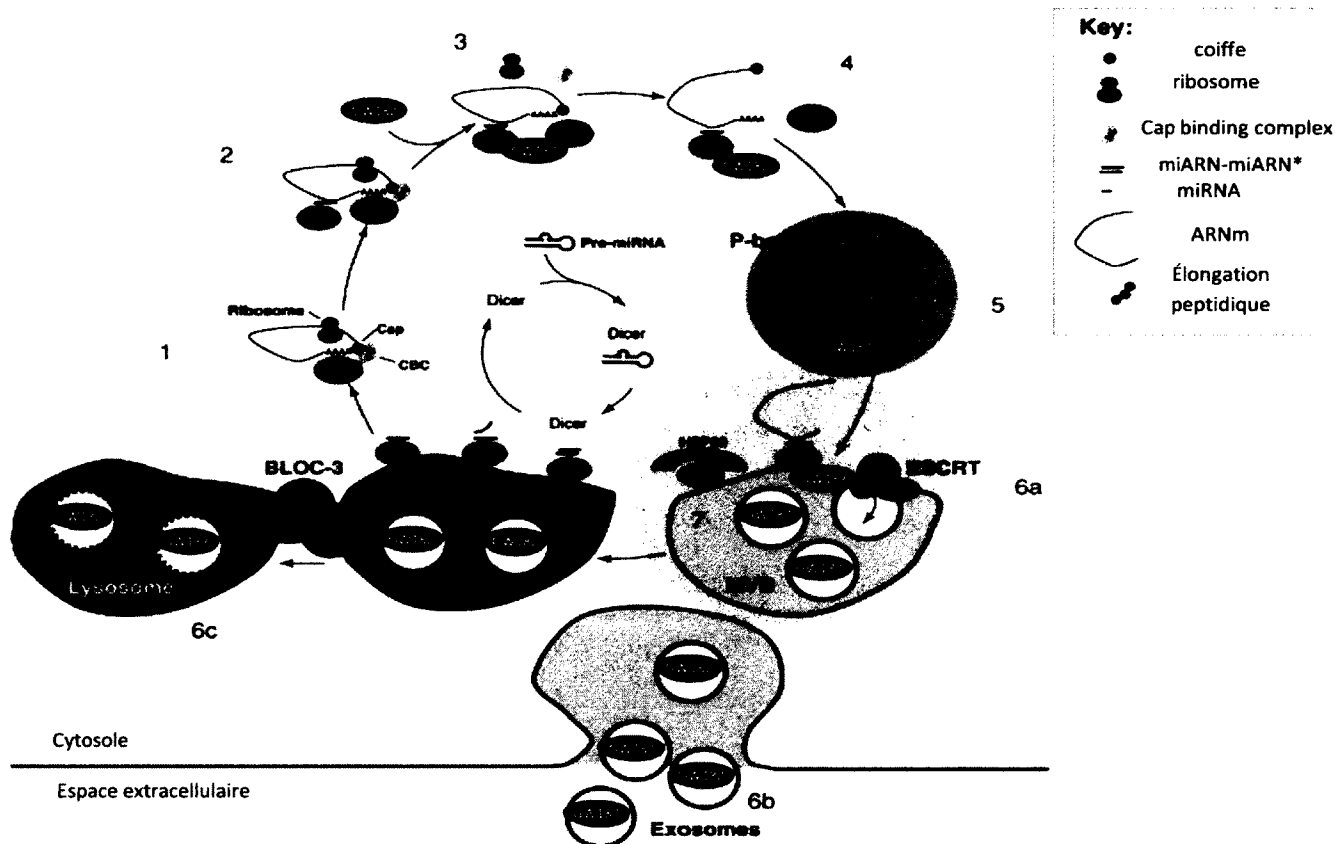
*La liaison de l'ARNi au complexe RLC (Ago-Dicer-TRBP/PACT) induit son association avec la membrane du RE via les protéines TRBP ou PACT. Le processus de maturation de certaines pré-miARN en miARN mature se produit possiblement au niveau de membrane du RE via la formation du RLC (1). De plus, les processus de sélection du brin guide et de son chargement sur les Ago se produisent aussi au sein de la membrane du RE (2). Cette association du RLC au RE permet de former le RISC actif près des ARNm traduits activement permettant un ciblage rapide des ARNm cibles par le RISC actif (3a). L'activité d'endonucléase des siRISC se manifeste lorsque le siRISC est toujours associé à la membrane du RE. Les RISC peuvent ensuite transiger vers d'autres entités cellulaires comme les P-Bodies et les MVBs afin de produire et favoriser l'activité des ARNi (4). Par la suite le RISC est soit recyclé, réactivé ou dégradé (5) (Adapté de Stalder et al, EMBO, 2013).*

### 3.4.2. Association du RISC avec le système endolysosomal

Certaines études ont démontré que le RISC est associée au système endolysosomal et qu'un défaut de maturation des endosomes en MVBs inhibe l'activité ARNi, tandis qu'une altération dans la formation des lysosomes augmente l'activité ARNi (Figure 17) (Azevedo et al, Gibbings et al, 2009, Gibbings & Voinnet, Gibbings et al, Gibbings et al, Lee et al, 2009, Stalder et al, 2013). Il a été démontré que le RLC et le RISC s'associent aux MVBs afin de favoriser la formation du miRISC mature et d'augmenter l'efficacité du *turnover* du



système d'ARNi. Les lysosomes sont également impliqués dans le turnover du système d'ARNi puisque la dégradation adéquate de GW182 dépend des lysosomes.



**Figure 17 : Rôle du système endolysosomal dans l'activité des ARNi**

Les protéines Ago chargées du brin guide du miARN se dissocient de la membrane des MVBs (1) et interagissent avec les ARNm cibles au niveau du cytoplasme (2). Par la suite, il y a recrutement d'autres facteurs protéiques dont la protéine GW182 (3). Cette interaction avec GW182 induit la dissociation de la protéine PABP de la queue polyA de l'ARNm (4). Ainsi, ce complexe peut être recruté au niveau des P-Bodies (5) pour être ensuite transféré vers les MVBs ou encore recruté directement au MVBs (6a). Au niveau des MVBs, le RISC peut continuer la répression de l'ARNm (7) et ensuite induire le recyclage et la réactivation des Ago (8-10) et/ou la dégradation ou le relargage extracellulaire de GW182 (6b et 6c). L'inhibition de la formation des MVBs induit une diminution de l'efficacité des miARN tandis qu'une dérégulation des lysosomes augmente l'activité des ARNi. (Adapté de Stalder et al., Trends in Cell Biology, 2010)

### 3.4.3. Association du RISC avec les P-Bodies

Les P-bodies sont des sites de triage, de stabilisation et de dégradation 5'-3' des ARNm. Ils contiennent les protéines Dcp1a/Dcp2 et XRN1 responsables de la dégradation 5'-3' des ARNm (Ding et al, 2005, Jakymiw et al, 2005, Liu et al, 2005a, Liu et al, 2005b, Sen & Blau, 2005). La formation des P-Bodies serait une conséquence de l'activité ARNi mais les P-Bodies ne seraient pas nécessaire à l'activité ARNi (Eulalio et al, 2007a). Il a été suggéré que la formation de complexes multiprotéiques non visibles au microscope entre le RISC et les différentes protéines constituant les P-bodies seraient responsables de l'activité ARNi (Chu & Rana, 2006, Eulalio et al, 2007a). Cette hypothèse est supportée par plusieurs études démontrant que les différentes protéines constituant les P-Bodies sont nécessaires à une activité optimale des ARNi (Bagga et al, 2005, Behm-Ansmant et al, 2006, Chu & Rana, 2006, Eulalio et al, 2007b, Liu et al, 2005a, Rehwinkel et al, 2005), indépendamment de la formation des P-Bodies. Les P-bodies sont également impliqués dans la dégradation 5'-3' des ARNm mais indépendante du système ARNi. Par exemple, certaines protéines lient les motifs ARE, comme la protéine TTP, se localisent dans les P-bodies et favorisent la stabilisation et/ou la dégradation 5'-3' des ARNm ayant ce motif (Buchan & Parker, 2009, Eulalio et al, 2007a, Kedersha et al, 2005, Parker & Sheth, 2007, Thomas et al, 2011). De plus, certaines protéines constituant les P-bodies sont impliquées dans la voie de dégradation des ARNm non-sens (nonsense-mediated mRNA decay). Il a été suggéré que les P-bodies ont un rôle dans le contrôle de qualité des ARNm et dans la dégradation des ARNm aberrants (Buchan & Parker, 2009, Cougot et al, 2004, Durand et al, 2007, Eulalio et al, 2007a, Fukuhara et al, 2005, Parker & Sheth, 2007, Sheth & Parker, 2003, Sheth & Parker, 2006, Thomas et al, 2011, Unterholzner & Izaurralde, 2004). Les P-bodies sont en étroite association avec les polysomes permettant ainsi la traduction spécifique de certains ARNm et d'en réprimer/dégrader d'autres. Les P-bodies sont également étroitement associés à d'autres types de granules tels que les granules de stress (GSs). Les GS sont impliquées dans la réponse au stress et favorisent la survie cellulaire (discuter dans la section 4.2.). Il est bien connu qu'il existe un grand dynamisme (échange) entre les P-Bodies, les GS et les polysomes permettant une régulation

spécifique du métabolisme des ARNm en réponse à certains stimuli (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Buchan & Parker, 2009, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009, Thomas et al, 2011).

La régulation de la formation des P-Bodies est encore bien peu caractérisée, cependant certaines études suggèrent que la formation des P-bodies est régulée par certaines voies signalétiques telles que la voie mTOR. L'inhibition du récepteur mTORC1 par un inhibiteur spécifique diminue grandement la formation des P-Bodies (Gudkova et al, 2011). De plus, la c-Jun N-terminal kinase (JNK) induit la phosphorylation de Dcp1a et sa localisation aux P-Bodies. Cependant, un niveau d'activité élevé et/ou soutenu de JNK induit la dispersion et la disparition des P-bodies démontrant l'importance d'une régulation adéquate des voies signalétiques (Buchan & Parker, 2009, Cargnello et al, 2012, Rzeckowski et al, 2011, Thomas et al, 2011). Une autre étude a démontré que la stimulation des neurones par du zinc induit un désassemblage des polysomes, l'agrégation ARN-dépendante de Dcp1a et la formation des P-Bodies suggérant un rôle du zinc dans la régulation de la traduction et de la formation des P-Bodies (Blumenthal & Ginzburg, 2008). Enfin, l'association de certains ARNm contenant des séquences ARE aux P-Bodies est régulée par la petite GTPase RhoA. L'activation de RhoA induit un relâchement des ARNm contenant une séquence ARE inhibant ainsi sa dégradation et favorisant sa stabilisation et/ou sa traduction (Buchan & Parker, 2009, Takahashi et al, 2011, Thomas et al, 2011).

### **3.5 La protéine prion et le système ARNi**

Une étude récente a attribuée à PrP<sup>C</sup> un rôle dans la régulation de l'efficacité des miARN (Gibbins & Voinnet, 2010, Gibbins et al, 2012). Les auteurs de cette étude ont démontré que PrP<sup>C</sup>, plus particulièrement la faible portion de PrP<sup>C<sup>tm</sup></sup> produit physiologiquement (<1%), interagit avec les protéines Ago au niveau des MVBs dans deux complexes distinct soit le RLC (Dicer-Ago1-Ago2) et le RISC (Ago1-Ago2-GW182) (Gibbins & Voinnet, 2010,

Gibbings et al, 2012). Cependant, PrP<sup>C</sup> augmente seulement l'efficacité des miARN sans affecter le processus de maturation des miARN. Les auteurs suggèrent que PrP<sup>C</sup> facilite la dissociation du complexe Ago-miARN du complexe RLC afin de favoriser la formation du complexe RISC (GW182-Ago-miARN-ARNm) et par conséquent augmente l'efficacité des miARN. Ils ont montré qu'*in vitro* le OR de PrP<sup>C</sup> interagit avec Ago2 et que les motifs GWG au sein du domaine OR est responsable de cette interaction (Figure 18 et 21). PrP<sup>C</sup> stabilise également l'association des MVBs avec les P-Bodies ce qui augmente probablement l'efficacité des miARN. Les auteurs proposent que dans les ESTs, le changement conformationnel de PrP<sup>C</sup> en une forme pathologique et la dérégulation du système endolysosomal observée dans les ESTs affectent probablement son rôle de régulateur de l'efficacité des miARN (Gibbings & Voinnet, 2010, Gibbings et al, 2009).

**GSRYPPQGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGLE**

**Figure 18 : Motifs GWG au sein du domaine OR de PrP<sup>C</sup>.**

*Séquence représentant le domaine OR de PrP<sup>C</sup>. Les motifs GWG seraient responsables de l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec les Ago et sont représentés en rouge.*

#### **4. La réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$ dépendante**

La survie des cellules de mammifères exposées à des conditions environnementales défavorables nécessite l'activation d'une réponse au stress intégrée qui reprogramme le métabolisme cellulaire vers la réparation des dommages moléculaires induite par le stress. Dans le cadre de cette thèse, nous ne développerons que la réponse au stress dépendante du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ .

##### **4.1. Bref aperçu de la réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$ dépendante**

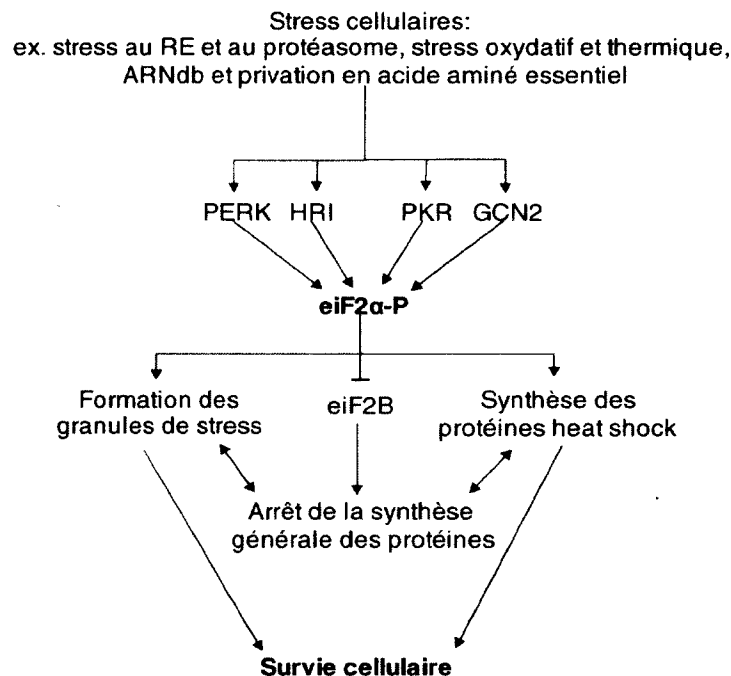
La réponse au stress cellulaire eIF2 $\alpha$  dépendante se caractérise par trois étapes (Figure 19):

1) l'activation d'une des quatre kinases de stress : HRI (heme-regulated inhibitor kinase) (Chen, 2007, Fagard & London, 1981, Liu et al, 2007, Wek et al, 2006), GCN2 (glucose control non repressible 2) (Jiang & Wek, 2005, Towle, 2007, Wek et al, 2006), PKR (RNA-dependent protein kinase) (Galabru & Hovanessian, 1987, Ito et al, 1999, Ruvolo et al, 2001, Saito, 1990, Wek et al, 2006, Wu & Kaufman, 1997) et PERK (PKR-like ER resident kinase) (Harding et al, 2000a, Harding et al, 2000b, Wek et al, 2006). Chacune des kinases de stress sont activées par différents stress cellulaires. Par exemple, PKR est activée par sa liaison à l'ARNdb induisant son autophosphorylation et sa dimérisation (Bommer et al, 2002, Galabru & Hovanessian, 1987, Li et al, 2006, Patel & Sen, 1998b, Wu & Kaufman, 1997, Wu & Kaufman, 1997). L'activation de PKR est aussi contrôlé par les protéines TRBP et PACT (Cosentino et al, 1995, Daher et al, 2009, Daniels & Gatignol, 2012, Ito et al, 1999, Patel & Sen, 1998a, Singh et al, 2011, Singh & Patel, 2012). En condition physiologique, PACT forme des homodimères et/ou hétérodimères avec TRBP et comme mentionné auparavant, ces complexes ont des rôles dans le système ARNi (Kok et al, 2007, Lee et al, 2013, Noland & Doudna, 2013). Il est connu que l'interaction entre TRBP et PACT inhibe le potentiel activateur de PACT sur PKR. TRBP interagit aussi avec PKR et permet de maintenir ou de rétablir PKR sous sa forme inactive (Cosentino et al, 1995, Daher et al, 2009, Daniels & Gatignol, 2012, Li et al, 2006, Singh et al, 2011, Singh & Patel, 2012). Cependant, lors d'une exposition à un stress cellulaire comme un stress oxydatif, la protéine PACT est activée induisant sa dissociation avec TRBP et la dissociation de TRBP avec PKR ce qui favorise l'interaction de PACT avec PKR. Cette interaction permet d'activer le domaine kinase de PKR, donc son autophosphorylation et sa dimérisation (Daher et al, 2009, Ito et al, 1999, Li et al, 2006, Patel & Sen, 1998a, Peters et al, 2009, Singh et al, 2009, Singh et al, 2011, Singh & Patel, 2012).

2) Par la suite, les kinases de stress activées induisent la phosphorylation de la Ser 51 du facteur d'initiation à la traduction, eIF2 $\alpha$ . La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  inhibe l'activité du facteur d'échange GDP en GTP, eIF2B. Cet effet antagoniste de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  empêche la formation du complexe tertiaire actif d'initiation de la traduction, GTP-eIF2 $\alpha$ -tRNA<sup>Met</sup>, inhibant ainsi l'initiation de la traduction (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson

& Kedersha, 2008, Bommer et al, 1991, Kedersha & Anderson, 2002, Krishnamoorthy et al, 2001, Kudlicki et al, 1987, Price & Proud, 1990).

3) L'arrêt de l'initiation de la traduction induit la formation des granules de stress ou GSs (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009) et la synthèse des protéines essentielles à la survie cellulaire telles que les chaperonnes heat shock protein (Hsp) (Head et al, 1994, Nakai & Ishikawa, 2000, Pelham, 1982, Tanabe & Nakai, 1999) .



**Figure 19 : La réponse au stress eiF2α dépendante**

Plusieurs stress cellulaires induisent la réponse au stress eiF2α dépendante, comme le stress au RE et au protéasome, le stress oxydatif et thermique, la présence d'ARNdb et la privation en acides aminés essentiels. Les différents stress cellulaires induisent l'activation des kinases de stress : PERK, HRI, PKR et GCN2. Ces kinases de stress phosphorylent le facteur d'initiation à la traduction eiF2α inhibant l'activité GTP transférase du facteur traductionnel eiF2B ainsi que la traduction générale des protéines. En plus, la phosphorylation d'eiF2α induit la formation des GSs et la synthèse des protéines essentielles à la survie cellulaire dont les protéines heat shock (Hsp). Les GSs contribuent à l'arrêt général de la synthèse protéique en séquestrant les ARNm non essentiels, ce qui favorise la traduction des ARNm essentiels à la survie cellulaire dont les Hsp.

## **4.2. Les granules de stress**

### **4.2.1. Formation des granules de stress**

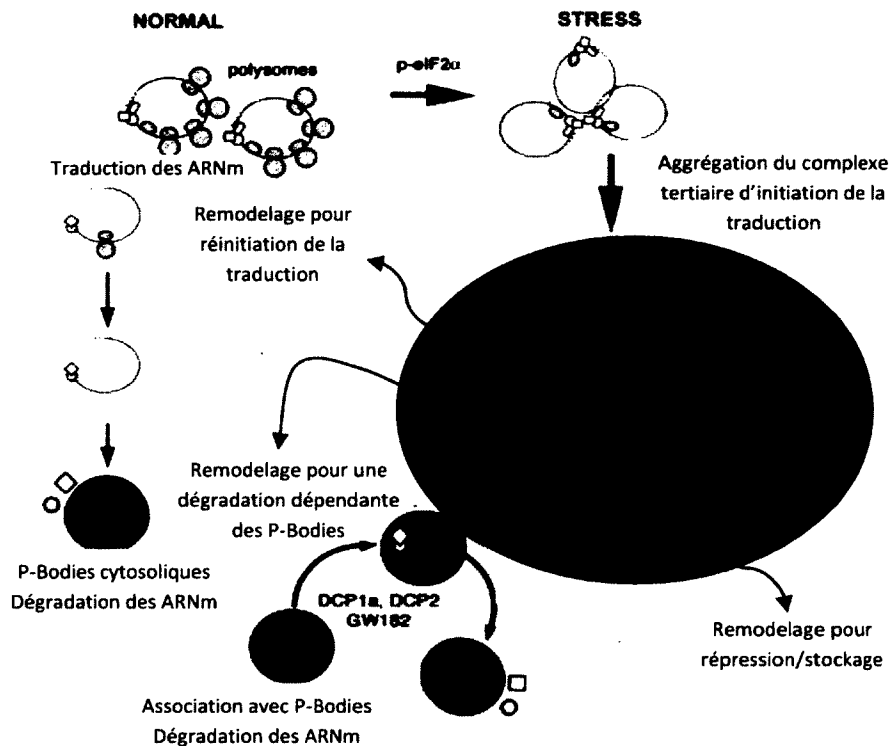
Les GS sont des granules ribonucléoprotéiques induites lorsque l'initiation de la traduction est affectée par différents mécanismes : par exemple en condition de stress cellulaire (Kedersha et al, 1999), par l'addition d'une drogue inhibant l'initiation de la traduction ou favorisant la dissociation des ribosomes aux ARNm (Dang et al, 2006, Mazroui et al, 2006, Mokas et al, 2009), par le knockdown de certains facteurs d'initiation (Mokas et al, 2009) ou par la surexpression de certaines protéines liant les ARNm et réprimant la traduction (Gilks et al, 2004, Kedersha et al, 2005, Matsuki et al, 2013, Mazroui et al, 2002, Wilczynska et al, 2005). En condition de stress cellulaire, deux voies principales inhibent l'initiation de la traduction et induisent la formation des GS soit : la voie dépendante de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la voie indépendante de la phosphorylation eIF2 $\alpha$ . Cette dernière est activée par des stress cellulaires spécifiques et elle implique différents facteurs d'initiation à la traduction (Dang et al, 2006, Emara et al, 2012, Emara et al, 2012, Fujimura et al, 2012, Fujimura et al, 2012, Mazroui et al, 2006, Mokas et al, 2009). Par exemple, la déphosphorylation de la protéine 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) qui interagit avec eIF4E empêche la formation du complexe de reconnaissance de la coiffe, nommé eIF4F (Emara et al, 2012, Fujimura et al, 2012, Mokas et al, 2009). Cette interaction induit également la formation de GSs non canoniques puisque leur composition est différente, par exemple, les facteurs qui favorisent normalement la survie cellulaire par leur localisation aux GSs ne sont pas présents dans ces GSs non canoniques. Ces GSs non canoniques favoriseraient plutôt la mort cellulaire. D'autres études ont démontré qu'une altération de l'activité ARN hélicase du facteur eIF4a induit aussi la formation des GSs. Ce facteur est essentiel pour le recrutement du ribosome sur l'ARNm et par conséquent, l'inhibition de son activité inhibe l'initiation de la traduction et induit la formation des GSs (Mazroui et al, 2006, Mokas et al, 2009). La formation des GS semblent aussi dépendre des P-Bodies puisque plusieurs facteurs protéiques sont associés aux deux entités (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson &

Kedersha, 2009, Kedersha & Anderson, 2007, Thomas et al, 2011) et que la formation des GS s'initierait juxtaposément aux P-Bodies suggérant que les P-Bodies influencent leurs formations (Buchan et al, 2008).

#### **4.2.2. Rôles des granules de stress**

Les GS sont impliquées dans le triage des ARNm puisqu'elles sont étroitement associées aux polysomes et aux P-Bodies permettant respectivement la traduction sélective et une dégradation ou stabilisation sélective de certains ARNm (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Buchan et al, 2008, Buchan & Parker, 2009, Hu et al, 2010, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009, Lavut & Raveh, 2012, Moser & Fritzler, 2013, Nonhoff et al, 2007, Thomas et al, 2011) (Figure 20).





**Figure 20 : Dynamisme entre GSs, P-Bodies et polysomes**

Les P-Bodies sont formés en condition physiologique (normale) et permettent de réguler le métabolisme des ARNm. Ils sont composés de protéines impliquées dans la dégradation et/ou la stabilisation des ARNm comme les protéines Dcp1a/Dcp2 et GW182. En condition de stress cellulaire, il y a phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ce qui engendre une accumulation et une agrégation du complexe ribosomique 48S induisant ainsi la formation des GSs (SG). Les GSs sont composées de plusieurs protéines pouvant transiger entre les différentes entités soit les polysomes et les P-Bodies. Ce dynamisme entre les GSs, les P-Bodies et les polysomes permet une régulation adéquate du métabolisme des ARNm favorisant ainsi la survie cellulaire. (Adapté de Kedersha et al., JCB, 2005)

Par exemple, l'ARNm codant Hsp70 est exclu des GSs et des P-Bodies afin d'induire spécifiquement son expression (Silver & Noble, 2012). De plus, il est connu que l'ARNm codant p21, un facteur anti-apoptotique, est d'abord stabilisé au niveau des GSs et transigent vers les polysomes pour induire spécifiquement sa traduction (Fournier et al, 2010, Fournier et al, 2013, Gareau et al, 2011). Hsp70 est une chaperonne favorisant le bon repliement des protéines et p21 est une protéine anti-apoptotique. Ainsi, ce

mécanisme d'exclusion permet de stabiliser/emmagasiner les ARNm et induire à des moments précis la traduction spécifique des ARNm codants les protéines essentielles à la survie cellulaire. D'autres études suggèrent que les P-bodies sont requis pour une formation et une activité efficace des GSs (Buchan et al, 2008, Moser & Fritzler, 2013, Nonhoff et al, 2007). Ceci démontre bien l'importance des GSs et du dynamisme entre les polysomes/P-bodies/GSs dans la réponse au stress et la survie cellulaire (Buchan et al, 2008, Lavut & Raveh, 2012, Moser & Fritzler, 2013, Nonhoff et al, 2007). Les GSs sont connues pour réguler l'apoptose par d'autres mécanismes. Plusieurs études ont démontré que les GSs séquestrent certains facteurs pro-apoptotiques. Par exemple, les protéines RACK1 et ROCK1 sont séquestrées dans les GSs ce qui les empêche d'interagir et d'activer la kinase MTK1 impliquée dans l'activation de l'apoptose (Arimoto et al, 2008, Tsai & Wei, 2010). La protéine TRAF2 (TNF- $\alpha$  receptor associated factor 2) est aussi séquestrée dans les GSs ce qui inhibe sa fonction activatrice de la voie TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B est un régulateur transcriptionnel clé de la réponse inflammatoire et de l'apoptose (Kim et al, 2005, Thomas et al, 2011, Yoneda et al, 2001). Cette séquestration des facteurs pro-apoptotiques favorise la survie cellulaire. Certains facteurs anti-apoptotiques, comme les kinases RSK2 (Ribosomal S6 kinase 2) et FAST (Fas-activated serine/threonine kinase) se retrouvent aussi associés aux GSs (Eisinger-Mathason et al, 2008, Li et al, 2004, Thomas et al, 2011). Cependant, contrairement aux facteurs pro-apoptotiques, cette association entre les facteurs anti-apoptotiques et les GSs favorise leur activité anti-apoptotique. Ces deux kinases sont connues pour lier une des protéines centrales des GSs, la protéine TIA-1. En condition de stress apoptotique, TIA-1 est connue pour induire l'expression des protéines pro-apoptotiques. Cependant en condition de stress non apoptotique, les protéines RSK2 et FAST interagissent, phosphorylent et agrègent TIA-1 afin de former les GSs. L'agrégation de TIA-1 inhibe son activité pro-apoptotique et modifie ces activités de régulateur des ARNm (Buchan & Parker, 2009, Eisinger-Mathason et al, 2008, Li et al, 2004). De plus, une étude récente a montré que les GS favorisent la survie cellulaire en diminuant la production de ROS. Cette activité d'antioxydant des GSs est contrôlée par deux protéines, USP10 et G3BP1. USP10 possède l'activité d'antioxydant et elle est

régulée par son interaction avec G3PB1 et la voie ATM. En condition physiologique, G3BP1 se trouve en excès comparativement à USP10 séquestrant ainsi tout l'USP10 libre. Cette interaction entre G3BP1 et USP10 inhibe l'activité anti-oxydante d'USP10. Lors de stress cellulaire, G3PB1 est déphosphorylée ce qui favorise son agrégation et la formation des GSs. Cette agrégation de G3BP1 induit forcément un changement conformationnel dans G3BP1. Les auteurs suggèrent que ce changement conformationnel de G3BP1 inhibe son activité pro-oxydatives c'est-à-dire sa capacité de séquestrer et d'inactiver l'USP10. USP10 est aussi localisé au niveau des GSs, cependant, il demeure accessible aux kinases de la voie ATM permettant son activation (Takahashi et al, 2013). De plus, il est connu qu'en condition de stress cellulaire apoptotique, la formation des GS est altérée, la production de ROS est augmentée et les facteurs pro-apoptotiques sont libérés et activés afin d'induire la mort cellulaire (Arimoto et al, 2008, Baguet et al, 2007, Eisinger-Mathason et al, 2008, Fournier et al, 2013, Fujimura et al, 2012, Gareau et al, 2011, Takahashi et al, 2013, Zou et al, 2011, Zou et al, 2012). En résumé, les GSs et le dynamisme entre les GSs, les P-Bodies et les polysomes sont nécessaire pour une réponse adéquate au stress cellulaire et pour la survie cellulaire.

## **5. Implication de PrP<sup>C</sup> dans le cancer**

Plusieurs études ont démontré que PrP<sup>C</sup> est impliquée dans divers types de cancer en particulier dans les processus tumorigéniques, de multi-résistances et métastatiques (Cheng et al, 2013, Dery et al, 2013, Du et al, 2013, Li et al, 2010, Li et al, 2011, Mehrpour & Codogno, 2010, Wang et al, 2011, Wang et al, 2012a, Yap & Say, 2012, Yu et al, 2012, Zhuang et al, 2012). Par exemple, il a été démontré récemment (Yu et al, 2012) que la diminution de l'expression de PrP<sup>C</sup> accentue la résistance des cellules cancéreuses mammaires au traitement à la doxorubicine en augmentant l'expression des protéines de la famille des Bcl-2. Cependant, les mécanismes exacts demeurent inconnus. Le nouveau rôle de régulateur de l'efficacité des miARN de PrP<sup>C</sup> pourrait contribuer aux différents processus associés au cancer.

## 6. Similitudes entre les ESTs et les autres maladies neurodégénératives

### 6.1. Propagation moléculaire et cellulaire des pathologies

Il y a plusieurs similitudes entre les ESTs et plusieurs autres maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington. Par exemple, elles sont toutes associées au mauvais repliement de protéines endogènes soit **PrP<sup>C</sup>** (ESTs); le peptide **amyloïde bêta** et la protéine **Tau** (Alzheimer); les protéines **Parkin**, **LRKK2** et  **$\alpha$ -synucléine** (Parkinson); et la protéine **huntingtin** (Huntington). La propagation moléculaire de la majorité des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>, Tau,  $\alpha$ -synucléine et huntingtin se fait par un mécanisme prion-like qui est très semblable au modèle proposé pour PrP<sup>Sc</sup> (Aguzzi & Rajendran, 2009, Angot et al, 2010, Brundin et al, 2010, Costanzo & Zurzolo, 2013, Frost & Diamond, 2010, Goedert et al, 2010). De plus, la propagation au niveau cellulaire de ces formes mal repliées se fait également par les mêmes mécanismes que PrP<sup>Sc</sup> soit par contact direct, par la voie de sécrétion, par la formation de *tunneling nanotubes* ou encore par la sécrétion des exosomes (Aguzzi & Rajendran, 2009, Angot et al, 2010, Brundin et al, 2010, Costanzo & Zurzolo, 2013, Emmanouilidou et al, 2010, Frost & Diamond, 2010, Goedert et al, 2010). De plus en plus d'évidence nous montre que ces maladies neurodégénératives ont le même potentiel infectieux que les ESTs (Aguzzi & Rajendran, 2009, Angot et al, 2010, Brundin et al, 2010, Costanzo & Zurzolo, 2013, Frost & Diamond, 2010, Goedert et al, 2010).

### 6.2. Implication possible de PrP<sup>C</sup> dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer

Récemment, il a été démontré que le niveau d'expression de PrP<sup>C</sup> affecte la synthèse de deux protéines reliées à la maladie de Parkinson, soit les protéines **Parkin** et  **$\alpha$ -synucléine** (Kralovicova et al, 2009). Les auteurs de cette étude ont montré que le *knock-down* ou le KO de PrP<sup>C</sup> augmente l'expression de Parkin mais diminue celle de l' $\alpha$ -synucléine, tandis que la surexpression de PrP<sup>C</sup> a l'effet contraire. Cependant, les

mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de ces deux protéines par PrP<sup>C</sup> et son implication dans la pathologie est encore inconnu.

Des études controversées ont montré que PrP<sup>C</sup> à un rôle important dans la toxicité reliée à la maladie d'Alzheimer (Fluharty et al, 2013, Guillot-Sestier et al, 2012, Kudo et al, Rushworth et al, 2012). Les études suggèrent que PrP<sup>C</sup> serait un récepteur des oligomères de l'amyloïde bêta et induit des voies signalétiques neurotoxiques. De plus, le clivage physiologique de PrP<sup>C</sup> diminue les effets toxiques de l'amyloïde bêta.

### **6.3. Altération du système endolysosomal et miARN**

Plusieurs mécanismes de neurotoxicité associées aux ESTs sont également impliqués dans ces maladies neurodégénératives comme la dérégulation du système endolysosomal et miARN (Ghose et al, Lee et al, 2012, Marti et al, 2010, Minones-Moyano et al, 2011, Savas et al, 2008). Par exemple, le mauvais repliement et l'agrégation de la protéine huntingtin affecte l'activité des petites GTPase Rab5 (Pal et al, 2006) et Rab11 (Li et al, 2008, Li et al, 2009, Li et al, Richards et al). Ces deux petites GTPase sont impliquées respectivement dans le transport des endosomes précoces et des endosomes de recyclage. Huntingtin possède comme PrP<sup>C</sup> des motifs GW/WG ce qui permettrait d'interagir avec les Ago (Gibbins et al, 2012, Savas et al, 2008). Il a été démontré que le knock down de huntingtin et l'expression d'un mutant pathologique diminuent l'efficacité des miARN et altèrent la formation des P-Bodies (Savas et al, 2008).

La maladie d'Alzheimer est une autre maladie neurodégénérative dont le système endolysosomal est affecté (Cossec et al, 2010, Ginsberg et al, 2010, Ginsberg et al, 2011, Ginsberg et al, 2010, Jiang et al, 2010, Yuyama & Yanagisawa, 2009, Ihara et al, 2012, Yang et al, 1998). Il a été démontré que les oligomères de l'amyloïde bêta ont la capacité d'induire un stress au RE et d'altérer le système endolysosomal (Umeda et al, 2011). Il est également connu que les mutants familiaux associés aux différentes protéines impliquées dans la maladies de Parkinson (Parkin,  $\alpha$ -synucléine, et LRRK2 (leucine-rich repeat kinase

2) induisent un dysfonctionnement du système endolysosomal et du système de dégradation des protéines (Alegre-Abarrategui et al, 2008, Alegre-Abarrategui & Wade-Martins, 2009, Gehrke et al, 2010, Higashi et al, 2009, Sancenon et al, 2012, Sloan et al 2012, Soper et al, 2011, Vitte et al, 2010). En plus, il a été démontré que la protéine LRRK2 peut interagir avec le RISC plus spécifiquement avec les Ago et que cette interaction est nécessaire pour une activité optimale des miARN (Gehrke et al, 2010) comme pour PrP<sup>C</sup>. Lors de mutations familiales, la protéine LRRK2 mutée a toujours la capacité d'interagir avec les Ago, cependant l'efficacité des miARN est diminuée (Gehrke et al, 2010).

Il serait intéressant d'investiguer si la dérégulation du système endolysosomal par ses différentes formes de protéines mal repliées altère l'activité des ARNi comme les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>.

#### **6.4. Implication de la réponse au stress dans les maladies neurodégénératives.**

Comme mentionné précédemment, le mauvais repliement de protéines endogènes est associé à plusieurs maladies neurodégénératives. Ces formes mal repliées vont induire un stress au RE et ainsi l'activation de la kinase de stress PERK menant à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Atwal & Truant, 2008, Colla et al, 2012b, Hoozemans et al, 2005, Hoozemans et al, 2007, Hoozemans et al, 2009, Jiang et al, 2012, Lee et al, 2012, O'Connor et al, 2008, Salminen et al, 2009, Vidal & Hetz, 2012). De plus, ces différentes maladies neurodégénératives sont également associées à une activation d'une autre kinase de stress, la kinase PKR (Bando et al, 2005, Bose et al, 2011, Bullido et al, 2008, Couturier et al, 2010, Morel et al, 2009, Mouton-Liger et al, 2012, Onuki et al, 2004, Paquet et al, 2009, Peel & Bredesen, 2003, Peel, 2004). Pour la maladie d'Alzheimer, il a été suggéré que l'activation de PKR est PACT dépendante puisqu'une corrélation a été observée entre le niveau d'expression de PACT, l'activation de PKR et la neurodégénérescence (Paquet et al, 2012). De plus, il a été démontré récemment que la protéine Tau est associée avec les GSs (Castellani et al, 2011, Vanderweyde et al, 2012). Les auteurs de ces études (Castellani et

al, 2011, Vanderweyde et al, 2012) suggèrent que les GSs sont des sites où s'initient la formation des formes toxiques et mal repliées de la protéine. Cependant, aucune étude n'a déterminée si la formation et l'intégrité des GSs est affectée dans ces différentes maladies neurodégénératives pathologies.

En résumé, la neurotoxicité induite dans plusieurs maladies neurodégénératives est associée soit à une dérégulation du système endolysosomal et d'ARNi, à l'augmentation du stress au RE, à une dérégulation de la réponse au stress ou encore à l'expression de PrP<sup>C</sup>. Nous proposons que ces différentes voies de toxicités induites dans les maladies neurodégénératives aient toutes la capacité d'affecter l'activité du système d'ARNi comme dans le cas des ESTs.

## **7. Problématique, hypothèses et objectif de recherche**

**Problématique** : PrP<sup>C</sup> est impliquée dans diverses maladies neurodégénératives telles que les maladies à prion ou les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs). Les mécanismes de neurotoxicité activés dans les ESTs sont encore peu caractérisés. Plusieurs études suggèrent que le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup> initie la pathologie en induisant deux mécanismes généraux de neurotoxicité soit : 1) la perte ou la subversion des fonctions physiologiques de PrP<sup>C</sup>; 2) le gain fonctionnel des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>. Jusqu'à ce jour, aucune thérapie ou médicament existe pour retarder la maladie. Ceci démontre bien l'importance d'étudier les rôles physiologiques de PrP<sup>C</sup>, leurs implications dans la neurotoxicité associée aux ESTs ainsi que les effets des formes toxiques et mal repliées de PrP<sup>C</sup> sur les divers processus cellulaires associés à la pathologie. Le système endolysosomal et la réponse au stress sont étroitement associés au système d'ARNi et sont affectés dans les ESTs. De plus, PrP<sup>C</sup> interagit avec le RISC au niveau de la membrane des vésicules du système endolysosomal, plus particulièrement les MVBs.

**Hypothèse** : Le système endolysosomal, d'ARNi ainsi que la réponse au stress sont altérés dans les ESTs et contribuerait à la neurotoxicité observées dans les pathologies.

**Objectif 1** : Étudier l'implication de la dérégulation du système endolysosomal par les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> affecte le système d'ARNi

**Objectif 2** : Investiguer l'implication des GSs et des P-Bodies dans la neurotoxicité associée aux EST et leur contribution dans la dérégulation de la réponse au stress et du système d'ARNi par les mutants de PrP<sup>C</sup>.



## **RÉSULTATS**

### **Article 1:**

#### **PRION PROTEIN FAMILIAL MUTANTS INTERFERE WITH MULTIVESICULAR BODIES MATURATION AND miRNA-RELATED ACTIVITY**

Simon Beaudoin, Guillaume Tremblay, Julie Motard, Xavier Roucou

Article soumis dans RNA

#### **CONTRIBUTIONS :**

J'ai fait 95% des expériences, l'analyse de tous mes résultats et j'ai écrit le manuscrit sous la supervision de mon directeur de recherche et une assistante de recherche. J'ai procédé aux différentes corrections demandées.

## RÉSUMÉ

Récemment, la protéine prion (PrP<sup>C</sup>) a été détectée dans les *multivesicular bodies* (MVBs) et les exosomes qui sont de petites vésicules dérivées des MVBs et sécrétées à l'extérieur de la cellule. Un des rôles de cette association de PrP<sup>C</sup> aux MVBs est de lier différentes protéines essentielles du miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) dont l'argonaute 2 (Ago2) ce qui favorise l'association du miRISC avec les vésicules du système endosomal et ainsi augmente l'efficacité des miARN. Cependant, l'implication de ce nouveau rôle de PrP<sup>C</sup> dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) n'a pas été investigué. Nous avons d'abord confirmé que PrP<sup>C</sup> interagit avec deux composantes du miRISC, Ago2 et GW182, au niveau des MVBs et que PrP<sup>C</sup> stimule l'efficacité des miARN. Nous avons aussi démontré que le domaine octapeptidique répété (OR) de PrP<sup>C</sup> est essentiel pour son interaction avec Ago2 et pour son rôle de stimulateur de l'efficacité des miARN. De plus, nous avons démontré que plusieurs mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP interfèrent avec la maturation des MVBs, inhibent l'efficacité des miARN et altèrent la formation des exosomes. Nous avons suggéré que ces altérations du système endosomal et miARN contribuent à la neurodégénérescence reliée aux ESTs.

PRION PROTEIN FAMILIAL MUTANTS INTERFERE WITH MULTIVESICULAR BODIES  
MATURATION AND miRNA-RELATED ACTIVITY

**Simon Beaudoin<sup>1</sup>, Guillaume Tremblay<sup>1</sup>, Julie Motard<sup>1</sup>, Xavier Roucou<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault, Sherbrooke,  
J1E 4K8 Quebec, Canada

To whom correspondence should be addressed: Dr Xavier Roucou, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault, Sherbrooke, Québec J1E 4K8, Canada, Tel. (819) 821 8000x72240; Fax. (819) 820 6831; E-Mail: [xavier.roucou@usherbrooke.ca](mailto:xavier.roucou@usherbrooke.ca)

**Keywords:** Prion protein, miRNA, RNA-induced silencing complex, Prion diseases, Neurodegeneration, Multivesicular bodies

**Running title :** PrP MUTANTS ALTER MVB AND miRNA ACTIVITY.

**ABSTRACT**

Recently, the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) was detected in multivesicular bodies (MVBs) and exosomes, secreted vesicles derived from MVBs. One intriguing feature of MVBs-localized PrP<sup>C</sup> is its ability to bind essential components of microRNA (miRNA)-induced silencing complex (miRISC), including members of the Argonaute family (Ago), and to promote miRNA activity. Whether PrP<sup>C</sup> familial mutants associated to inherited forms of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are still able to promote miRNA activity is unknown. Here, we confirm that PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the miRISC components Ago2 and GW182 within MVBs, and stimulates miRNA activity. We also show that PrP<sup>C</sup> lacking the octapeptide repeat (OR) domain in the unstructured N-terminal region cannot interact with Ago2 or rescue miRNA activity in PrP<sup>C</sup> knockdown cells. Most importantly, we show that several PrP<sup>C</sup> familial mutants as well as an artificial cytoplasmic form of PrP<sup>C</sup> interfere with the maturation of MVBs, inhibit miRNA activity and alter exosomes production. We suggest that decreased MVBs maturation and miRNA activity may participate in neuronal degeneration in familial TSEs.

## INTRODUCTION

Prion diseases, or Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), are infectious and invariably fatal neurodegenerative disorders. TSEs are caused by a misfolded isoform of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) termed PrP<sup>Sc</sup> which is infectious and self-propagating (Prusiner, 1998). In human, they may present with sporadic (~85%), inherited (~15%), or acquired by infection (~less than 1%) manifestations, all of which involve modification of the cellular prion protein PrP<sup>C</sup> (Wadsworth & Collinge, 2007). The underlying neurotoxic mechanism of TSEs is still misunderstood, but increasing evidence point to a loss of or subversion of the normal function of PrP<sup>C</sup> (Watt et al., 2012; Jodoin et al., 2007; Singh et al., 2009). In this context, it is essential to elucidate the cellular pathways in which PrP<sup>C</sup> is involved.

There is a lot of evidence that the endolysosomal system is altered during TSEs pathogenesis and participates in prion conversion (Coleman et al., 2012; Kovacs et al., 2007; Ashok & Hegde, 2009; Marijanovic et al., 2009). Moreover, some familial mutants associated with inherited TSEs and an artificial cytoplasmic PrP mutant (CyPrP) inhibit the maturation of endolysosomal system, including multivesicular bodies (MVBs), via an interaction with the mono-ubiquitin ligase Mahogunin (Aguzzi & Steele, 2009; Chakrabarti & Hegde, 2009). Interestingly, there is a physical association between MVBs and Ago2 and GW182, two core components of the microRNA-induced silencing complex (miRISC) responsible for miRNA activity. MVBs regulate miRISC formation and turnover, and blocking the formation of MVBs partially impairs miRNA silencing (Gibbings & Voinnet, 2010; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009). GW182 interaction with Ago is mediated by GWG motifs (Chekulaeva et al., 2010; Takimoto et al., 2009). Strikingly, the octapeptide repeat (OR) region of PrP<sup>C</sup> contains four GWG motifs and PrP<sup>C</sup> colocalizes with Ago2 and GW182 in the MVBs and enhances miRNA activity by promoting accumulation of miRNA complexes (Gibbings et al., 2012). These observations prompted us to test if mutations associated with inherited forms of TSEs impair this novel function of PrP<sup>C</sup>.

Here, we confirm that PrP<sup>C</sup> interacts with GW182 and Ago2, and that PrP<sup>C</sup> is essential to maintain efficient miRNA activity. We demonstrate that the OR region of PrP<sup>C</sup> is crucial for the interactions between PrP<sup>C</sup>, Ago2 and for miRNA activity regulation. We selected five mutants of PrP<sup>C</sup> representing two phenotypes of inherited human prion diseases, familial Creutzfeldt-Jakob disease (E200K, D178N) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (P102L, Y145X, Q160X). We also used an artificial mutant that accumulates in the cytoplasm which has been proposed to mimic a toxic mechanism in TSEs (Mishra et al., 2003; Kristiansen et al., 2005; Goggin et al., 2008; Chakrabarti & Hegde, 2009). We show that PrP<sup>C</sup> mutants decrease miRNA activity and alter the maturation of MVBs and exosomes production. We propose that deregulation of MVBs processing and miRNA activity by PrP<sup>C</sup> familial mutants may represent a pathogenic mechanism in inherited TSEs.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies

Primary antibodies used for immunofluorescence were mouse monoclonal anti-PrP SAF32 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA, 189720; IF and WB: 1 $\mu$ g/ml; IP: 10 $\mu$ g/ml) and 3F4 (Millipore, Billerica, MA, USA, MAB1562; IF and WB: 1/1000; IP: 10 $\mu$ l) antibodies, rabbit polyclonal anti-Ago2 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab32381; IF: 2.5 $\mu$ g/ml; WB: 2 $\mu$ g/ml; IP: 5 $\mu$ g/ml), anti-GW182 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab87541; IF and WB: 1/500; IP: 4 $\mu$ l), anti-Alix (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab76608; IF: 5 $\mu$ g/ml; WB: 1 $\mu$ g/ml; IGS:1/100), anti-CD63 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-15363; IF: 1/100; WB: 1/200; IGS: 1/100), anti-rab7a (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-10767; IF: 1/100). Secondary antibodies were rabbit Alexa Fluor 633 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Burlington, ON, CA, A21072 (IF: 1/1000)) and mouse Alexa Fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Burlington, ON, CA, A11017 (IF: 1/1000)) for PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>C</sup> mutants detection. For western blot and immunoprecipitation analyses, antibody used were mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A5441; WB: 1/10000), anti-Ago2 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab57113; WB: 2.5 $\mu$ g/ml; IP: 5 $\mu$ g/ml), anti-GW182 [4B6] (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab15843; WB: 2 $\mu$ g/ml; IP: 5 $\mu$ g/ml) and rabbit polyclonal anti-PMP70 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, P-0497; WB: 1 $\mu$ g/ml; IP: 2 $\mu$ g/ml), anti-PrP (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab703; WB: 1/2000; IP: 4 $\mu$ l). Secondary antibodies were rabbit (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe, QC, CA, NA934V; WB:1/5000) or mouse IgG HRP (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe, QC, CA, NA931V; WB: 1/5000). Secondary antibody for the immunogold labelling was rabbit IgG 12nm gold bead (Jackson immunoresearch laboratories inc., West Grove, PA, USA, 111205144; IGS: 1/20).

## Cloning and plasmids

All primers were purchased from IDT and their sequences are outlined in Table S1. Cloning of PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>GFP</sup> in pcDNA3.1(+) / pCEP4 $\beta$  (Invitrogen, Burlington, ON, CA) was described previously (Grenier et al., 2006). PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> and PrP $\Delta$ OR (deletion of amino acids 41-92) were cloned by PCR overlap. CyPrP (Grenier et al., 2006) was inserted into pGFPC1, and CyPrP<sup>GFP</sup> was transferred into pcDNA3.1(+). E200K, D178N and P102L mutants were cloned by PCR overlap. Q160X and Y145X mutants were generated from PrP<sup>C</sup> by standard PCR. PCR products were then introduced in HindIII and BamHI restriction sites of pcDNA3.1(+). All constructs were sequenced in both orientations. pGL3 control vector (E1741) and pRL-TK (E2241) vector were obtained from Promega (Cambridge, MA, USA) and pRL-TK let-7a (plasmid #11324) from Addgene (Cambridge, MA, USA).

**Table S1: Oligonucleotides used to introduce mutations in PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>GFP</sup>**

Oligonucleotide Name	Sequence (5'-3')
PrP-Fw	CCCAAGCTTGTAAATGGCGAACCTTGGCTGCTGG
PrP-Rv	CGCGGATCCTCATCCCCTATCAGGAAGATG
PrP $\Delta$ OR-Rv	CCGCTACCCACAAGGAGGTGGCACCCACAGTCA
PrP $\Delta$ OR-Fw	CACCTCCTTGTGGGTAGCGGTTGCCTCCAG
PrP $\Delta$ OR <sup>GFP</sup> -Rv	TGACTGTGGGTGCCACCCCTGTACAGCT
PrP $\Delta$ OR <sup>GFP</sup> -Fw	AGCTGTACAAGGGTGGCACCCACAGTCA
PrP-E200K-Rv	CGTCGGTCT <u>I</u> GGTGAAGTTCTCC
PrP-E200K-Fw	GGAGAACTTCACCA <u>A</u> AGACCGACG
PrP-D178N-Rv	GATATTGACGCAGT <u>G</u> TGCACAAAGTTG
PrP-D178N-Fw	CAACTTTGTGCACA <u>A</u> CTGCGTCAATATC
PrP-P102L-Rv	GGCTTACT <u>A</u> GCTTGTTCCTG
PrP-P102L-Fw	CAGTGGAAACAAGCT <u>A</u> GTAAAGCC
PrP-Q160X-Rv	CTATGGATCCT <u>C</u> ATTGGTTGGGGTAACGGTG
PrP-Y145X-Rv	CTATGGATCCT <u>C</u> AATAGTCACTGCCGAAATGTATGATGG

N.B. Introduced mutations are underlined in the oligonucleotide sequences.



### **Cells culture and transfections**

Mouse neuroblastoma N2a, human embryonic kidney HEK293 and cervical HeLa cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal bovine serum and non-essential amino acid (Wisent, Montreal, QC, CA). For immunofluorescence experiments, N2a and HEK293 cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>C</sup> mutants using GeneCellin transfection reagent (BioCellChallenge, Toulon, cedex 9, FR), according to the manufacturer's instructions.

For knockdown and rescue experiments, HEK293 and HeLa cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with 100 nM PrP<sup>C</sup> siRNA-1 (Ambion, Burlington, ON, CA, SI01389535), siRNA-6 (Ambion, Burlington, ON, CA, SI03019324), siRNA-7 (Ambion, Burlington, ON, CA, SI03019625), or shRNA *PRNP*-5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, TRCN000008468). Controls were control siRNA (Promega, Cambridge, MA, USA, AM4611) and control shRNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, SHC002). Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, empty vector, PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>ΔOR</sup> constructs were transfected for 24 h with GeneCellin. After 24 h, cells were co-transfected with pRL-TK let-7a or pRL-TK and pGL3 plasmids at equal molar ratio with GeneCellin. For miRNA activity measurements with PrP<sup>C</sup> mutants, HEK293 and HeLa cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>C</sup> mutants using GeneCellin. After 24 h, cells were co-transfected with pRL-TK or pRL-TK let-7a and pGL3 plasmids.

### **Immunofluorescence and confocal microscopy**

Cells were fixed in methanol 10 min at -20°C and immunofluorescence was performed according to the antibodies manufacturer's protocol. Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to an inverted microscope with a 63× oil immersion objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 405 nm (diode laser), 488 nm (40 mW argon laser) and 633 nm (helium–neon laser) and signals

were collected sequentially. Serial horizontal optical sections of 320 X 320 pixels were taken at 0,5  $\mu\text{m}$  intervals through the entire thickness of cells. Images were typically acquired from cells with similar size from each experimental condition using identical instrumental settings. For illustration purposes images were pseudocolored according to their original fluorochromes, merged (FluoView software, Olympus), cropped and assembled (Adobe Photoshop software, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

### **Luciferase assays**

Luciferase activities were measured with the Dual-luciferase Reporter Assay kit (Promega, Cambridge, MA, USA,) according to the manufacturer's protocol using a Glomax 20/20 luminometer (Promega, Cambridge, MA, USA,) in parallel with western blot analysis.

### **Immunoprecipitation and Western Blot**

Immunoprecipitations were performed as previously described (Beaudoin et al., 2009). For GFP-tagged proteins, the chromotek GFP-trap immunoprecipitation system (Allele Biotech-Innovative Technology, San Diego, CA, USA) was used. For other proteins, protein A/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-2003) were used. Twenty-five micrograms of each lysate (10%) was loaded on the gel (input) with total immunoprecipitation reactions. Other western blots were performed as previously described (Goggin et al., 2008).

### **Northern Blot**

Total RNA was purified by mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Burlington, ON, CA, AM1560). 100  $\mu\text{g}$  of total RNA was fractionated on a 15% polyacrylamide gel for 1 h and transferred into Hybond-H + transfer membrane (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe,

QC, CA). Following transfer, RNA was crosslinked to the membrane using a UV crosslinker. Oligonucleotide complementary to the target let-7a miRNA or 5S ribosomal RNA were radiolabelled using gamma-<sup>32</sup>P ATP and T4 polynucleotide kinase (Life Technologies, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's protocol. Membranes were hybridized with the labeled probes using hybridization buffer (50% formamid, 5X SSC, 1% SDS, 5% Denhardt, 100 µg/ml salmon sperm DNA) for 18 h at 42°C. After hybridization, membrane were washed twice with 2X SSC, 0.2% SDS and three times with 0.2% SSC, 0.02% SDS, exposed to a phosphoscreen (GE Healthcare), scanned using a Typhoon apparatus (GE Healthcare) and quantified using the ImageQuant software (GE Healthcare).

### **Exosome purification and quantification**

HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% exosome-depleted heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent, Montreal, QC, CA). Cells plated at 4x10<sup>6</sup> cells in 100 mm petri dishes were transfected 24 h later with empty vector, wild-type or mutant PrP<sup>C</sup> and the culture medium was changed 8 h post-transfection. After 72 h, the culture medium was collected and exosomes were purified using the ExoQuick-TC purification kit (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer's protocols. Exosomes were quantified with the CD63 ExoELISA kit (System Biosciences, Mountain View, CA, USA). For the characterization experiments (electron microscopy, immunogold labelling and western blots), pellets of purified exosome were resuspended in PBS and 1/10<sup>th</sup> was used for electron microscopy, immunogold labelling or western blot experiments.

### **Immunogold labeling and electron microscopy**

For conventional electron microscopy, 1/10<sup>th</sup> of resuspended exosomes was applied for 1 h to copper grids. After, the grids were incubated 10 min in 2% paraformaldehyde. The samples were post-fixed with 2.5% glutaraldehyde for 10 min and several washing steps

with deionized water were done before the coloration step. Coloration was done with 2% uranyl acetate for 15 min and the samples were embedded with a drop of 0.13% methyl cellulose and 0.4% uranyl acetate for 5 min. After drying, the samples were examined with an Hitachi electron microscope operated at 80 kV.

For the immunolabeling, following the first fixation step, the grids were incubated with 30  $\mu$ l of primary antibody diluted in 0.1% BSA/PBS 1X for 1 h. After several washing steps, the grids were incubated for 1 h with 30  $\mu$ l of an anti-rabbit antibody coupled with 12 nm gold beads. The samples were post-fixed and the subsequent steps were identical to conventional electron microscopy.

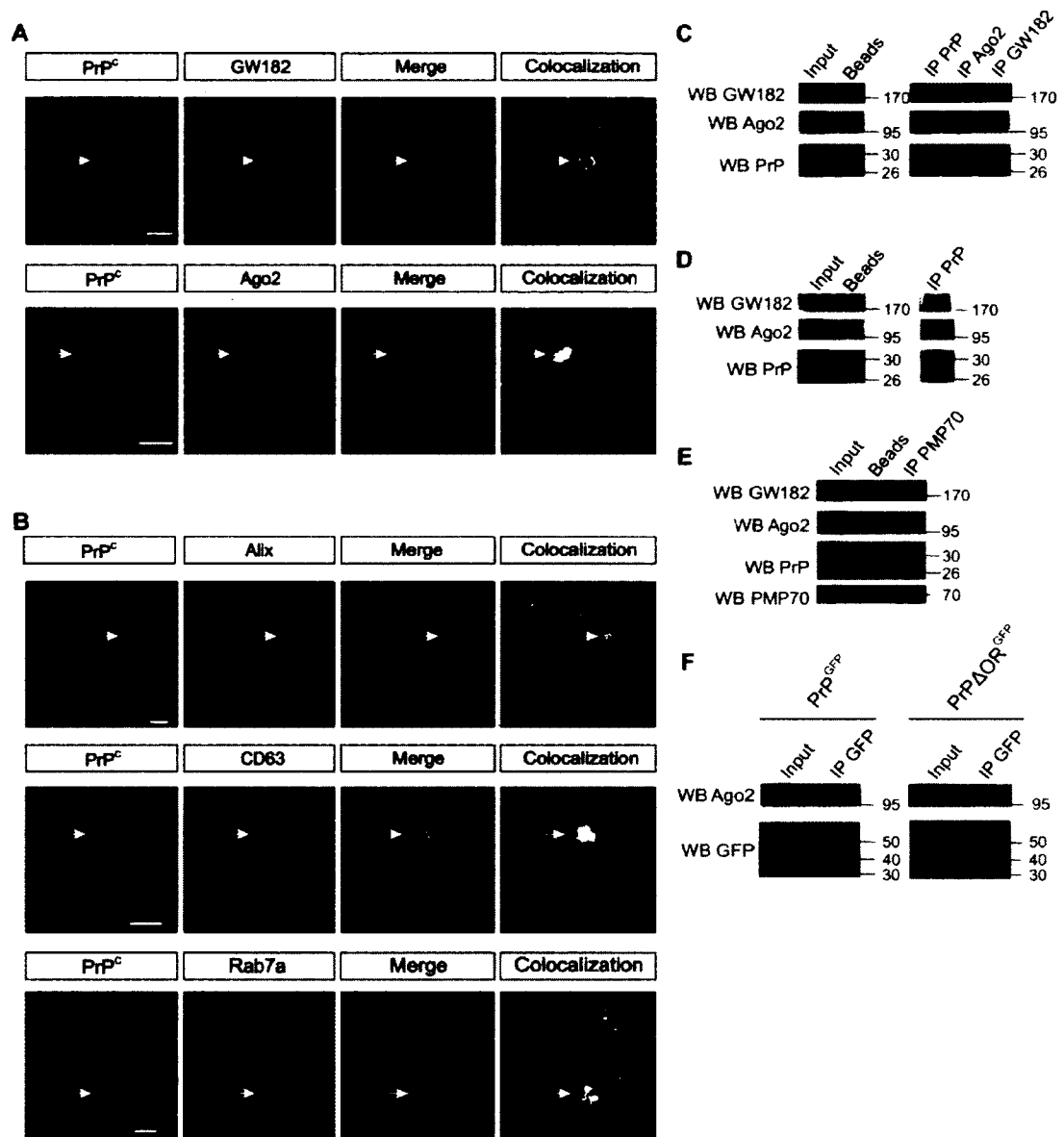
#### **Densitometric analyses and statistical analyses**

All densitometric analyses were performed using Image J software on a minimum of 3 independent experiments. All values were normalised with actin and are expressed as means  $\pm$  s.d. All statistical analyses were performed with Sigma Plot.

## RESULTS

### **The OR domain is crucial for PrP<sup>C</sup> interaction with miRISC in MVBs and for efficient promotion of miRISC activity**

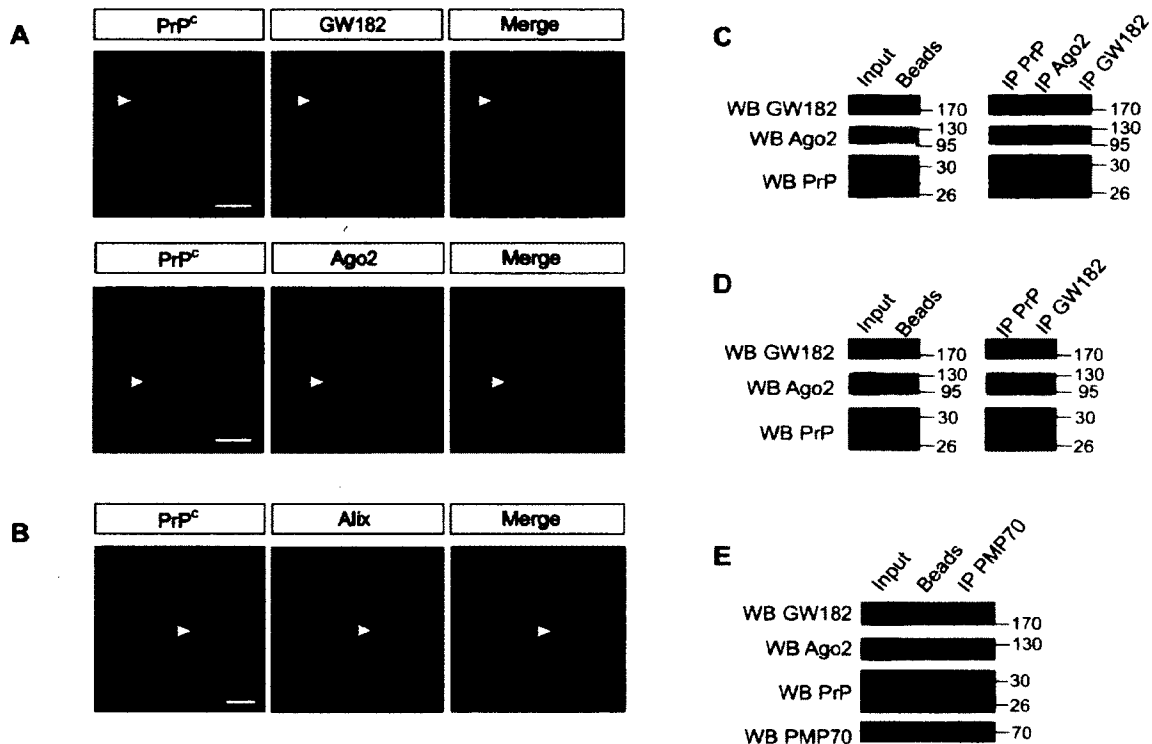
PrP<sup>C</sup> is a protein with several interaction partners, including cytoplasmic RNA binding proteins (Spielhauer & Schatzl, 2001). Recently, a direct interaction was demonstrated between PrP<sup>C</sup> and Ago2 and GW182 proteins, two miRISC core components. This interaction occurred in the MVBs of HeLa and N2a cells (Gibbins et al., 2012). We thought that it was important to validate these results in our experiments. We confirmed by immunofluorescence the colocalization of endogenous PrP<sup>C</sup> with GW182 and Ago2 in MVB-like structures in the cytoplasm of N2a (Fig. 1A) and embryonic HEK293 cells (Fig. S1A). In agreement with these results, Ago2 and GW182 were co-immunoprecipitated with either a monoclonal antibody targeting PrP N-terminus (Fig. 1C), or a polyclonal antibody (Fig. 1D), but not with an antibody against PMP70 protein, an unrelated peroxisomal membrane protein (Fig. 1E). Importantly, PrP<sup>C</sup> was also co-immunoprecipitated reciprocally using anti-Ago2 and anti-GW182 antibodies (Fig. 1C). Similar results were obtained in HEK293 cells (Fig. S1C-E). PrP<sup>C</sup> also partially co-localized with three proteins present in MVBs and late endosomes, Alix (Figs 1B, S1B), CD63 and Rab7a (Fig. 1B). This result is consistent with previously reported colocalization and interaction between PrP<sup>C</sup> and Rab7a in neuronal cells (Zafar et al, 2011). Together, these results corroborate previous reports showing PrP<sup>C</sup> interaction with miRISC in MVB-like structures (Gibbins et al, 2012). Bio-informatics studies revealed that PrP<sup>C</sup> OR region has a predicted GWG motif (Karlowski et al., 2010; El-Shami et al., 2007), and glutathione S-transferase-tagged OR domain associates with Ago2 in vitro (Gibbins et al., 2012). However, the implication of the OR with a PrP<sup>C</sup> mutant devoid of OR remained to be tested. Here, we show that in contrast to PrP<sup>GFP</sup>, PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> displayed no detectable interaction with Ago2 demonstrating that the OR domain is essential for this interaction (Fig. 1F).



**Figure 1: PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of miRISC, Ago2 and GW182 proteins, in MVB organites of N2a cells.**

(A) Confocal microscopy of endogenous PrP<sup>C</sup> (green channel) with GW182 or Ago2 (red channel). (B) MVBs localization is confirmed by confocal microscopy of PrP<sup>C</sup> with Alix, CD63 and Rab7 (upper, middle and lower panels, respectively). Right panels represent the overlapping green and red signals. Scale bar : 5  $\mu$ m. (C) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is determined by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 in PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 immunoprecipitates (IP). PrP<sup>C</sup> was immunoprecipitated with monoclonal antibody SAF32. (D) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is confirmed by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 after PrP<sup>C</sup>

immunoprecipitation with polyclonal antibodies. (E) Co-immunoprecipitation specificity is confirmed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2, PrP<sup>C</sup> and PMP70 after immunoprecipitation of PMP70. Input represent 10% of lysate used for IP. (F) The implication of OR was confirmed by western blot analyses of Ago2 and PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> after immunoprecipitation of GFP from N2a cells expressing PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup>.

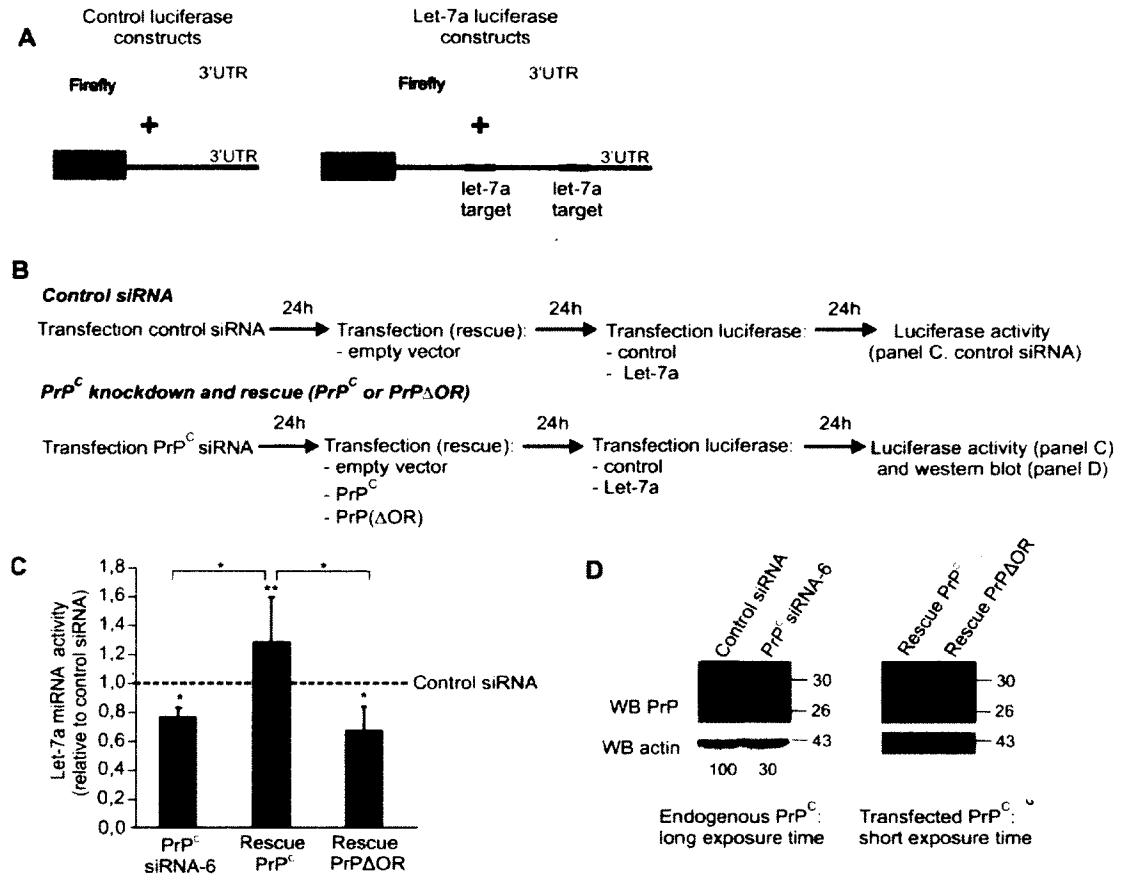


**Figure S1: PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of RISC, Ago2 and GW182 proteins, in MVB organites of HEK293 cells.**

(A) Confocal microscopy of endogenous PrP<sup>C</sup> (green channel) with GW182 or Ago2 (red channel). (B) MVB localization is confirmed by confocal microscopy of PrP<sup>C</sup> with Alix. Scale bar: 5  $\mu$ m. (C) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is revealed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2 and PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 IP. PrP<sup>C</sup> was immunoprecipitated with monoclonal antibody SAF32. (D) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is confirmed by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 after PrP<sup>C</sup> immunoprecipitation with polyclonal antibodies and GW182 immunoprecipitation. (E) Co-immunoprecipitation specificity is confirmed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2, PrP<sup>C</sup> and PMP70 on PMP70 IP. Input represent 10% of lysate used for IP.

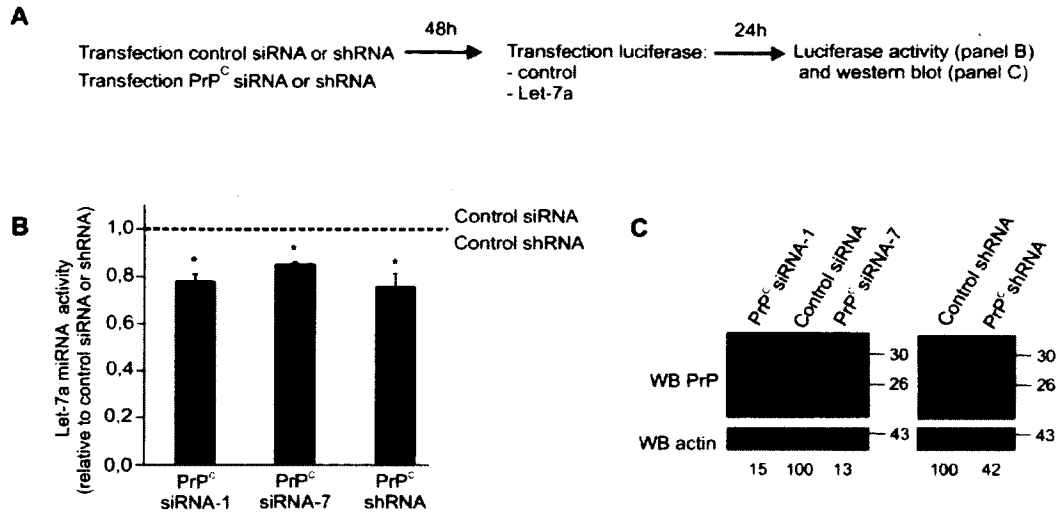
Several proteins containing GWG motifs are known to regulate the miRNA pathway via interactions with AGO proteins (Castilla-Llorente et al., 2012; El-Shami et al., 2007; Eulalio et al., 2009), and PrP<sup>C</sup>-deficient cells display reduced miRNA activity (Gibbings et al., 2012). In order to further investigate the implication of PrP<sup>C</sup> and its OR region in miRNA activity, we carried out luciferase assays in cells transfected with a *Renilla* construct flanked with a 3'UTR with let-7a target sites, and normalized this activity with a construct devoid of let-7a target sites (Fig. 2A). In this experiment, HEK293 cells were expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup>, or were treated with a siRNA against PrP<sup>C</sup> and transfected with empty vector or with PrP<sup>C</sup> or PrP $\Delta$ OR (Fig. 2B). We demonstrate that the miRNA activity is significantly decreased in PrP<sup>C</sup> knockdown HEK293 and HeLa cells (Figs 2C, S2), leading support to previously reported results showing that PrP<sup>C</sup> is not essential for but improves the efficacy of miRNA activity (Gibbings et al., 2012). We additionally observed that rescue of PrP<sup>C</sup> expression through transfection of wild-type PrP<sup>C</sup>, but not PrP $\Delta$ OR, restored the miRNA activity (Fig. 2C). Western blot in Fig. 2D illustrates PrP<sup>C</sup> knockdown efficacy and rescue. These data were confirmed in HeLa cells (Fig. S3). Our results confirm the influence of PrP<sup>C</sup> on miRNA activity and establish the importance of the OR region for this regulation.





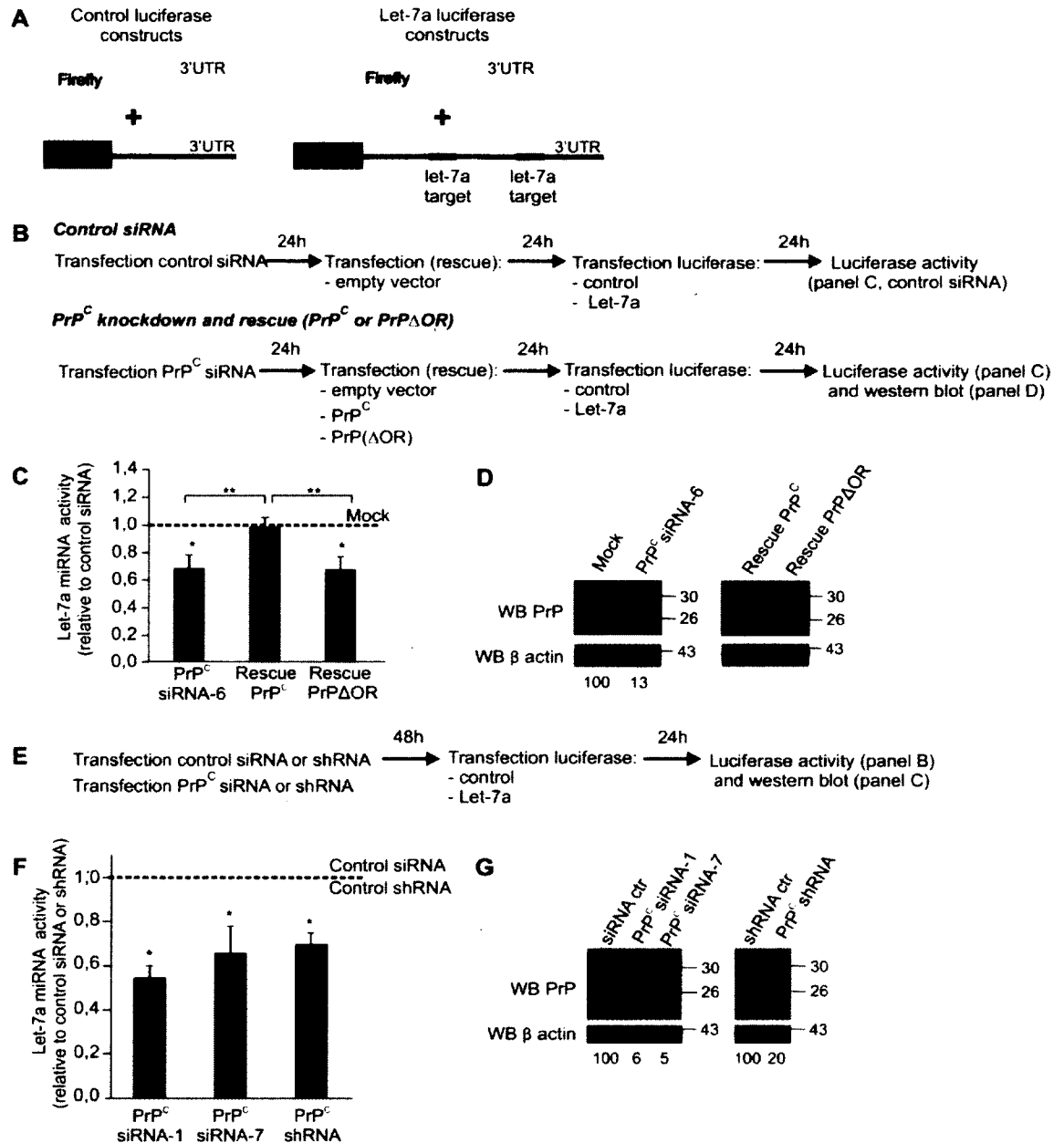
**Figure 2: Efficient miRNA activity depends on the OR of PrP<sup>C</sup>.**

(A) Diagram of Renilla luciferase (RLuc) and Firefly luciferase (FLuc) activity reporters. RLuc activity is normalized to FLuc activity. The let-7a miRNA activity is determined by the ratio of normalized RLuc activity from a construct with two let-7a target sites in the 3'UTR to the normalized RLuc activity from a construct with no let-7a target sites in the 3'UTR. (B) Diagram of the experimental design. (C) The let-7a miRNA activity (let-7a RLuc / RLuc) was determined in HEK293 cells treated with a control siRNA or PrP<sup>C</sup> siRNA-6. After 24 h, cells were either transfected with empty vector (PrP<sup>C</sup> siRNA-6), a vector expressing PrP<sup>C</sup> (rescue PrP<sup>C</sup>) or a vector expressing PrPΔOR (rescue PrPΔOR). The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA. Error bars indicate s.d. (n = 5; student's t-test \*P < 0,001, \*\*P = 0,02 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method P < 0,001). (D) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown and rescue in HEK293 cells. Note that a long exposure time was required to detect endogenous PrP<sup>C</sup> expression and knockdown, compared to PrP<sup>C</sup> knockdown rescued with PrP<sup>C</sup> or PrPΔOR. Actin was used as a loading control. A representative experiment from n = 5 is shown. Densitometric analyses show that PrP<sup>C</sup> levels were reduced from 100% to 30% with siRNA-6, as indicated below the blots (s.d. = 17; student's t-test P < 0,001).



**Figure S2: siRNA and shRNA treatment against PrP<sup>C</sup> decrease let-7a miRNA activity.**

(A) Diagram of the experimental design. (B) HEK293 cells were treated with a control siRNA or shRNA, or PrP<sup>C</sup> siRNA-1, siRNA-7 or shRNA. The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA or shRNA. Error bars indicate s.d. ( $n = 5$ , student's t-test  $*P < 0,001$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $P < 0,001$ ). (C) A representative western blot confirms the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdowns. Actin was used as a loading control. Densitometric analyses indicate that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 15% (siRNA-1), 13% (siRNA-7), and 42% (shRNA) as indicated below the blots ( $n = 5$ ; s.d. = 6 for siRNA-1; s.d. = 7 for siRNA-7; s.d. = 19 for shRNA; student's t-test  $*P < 0,001$ ).



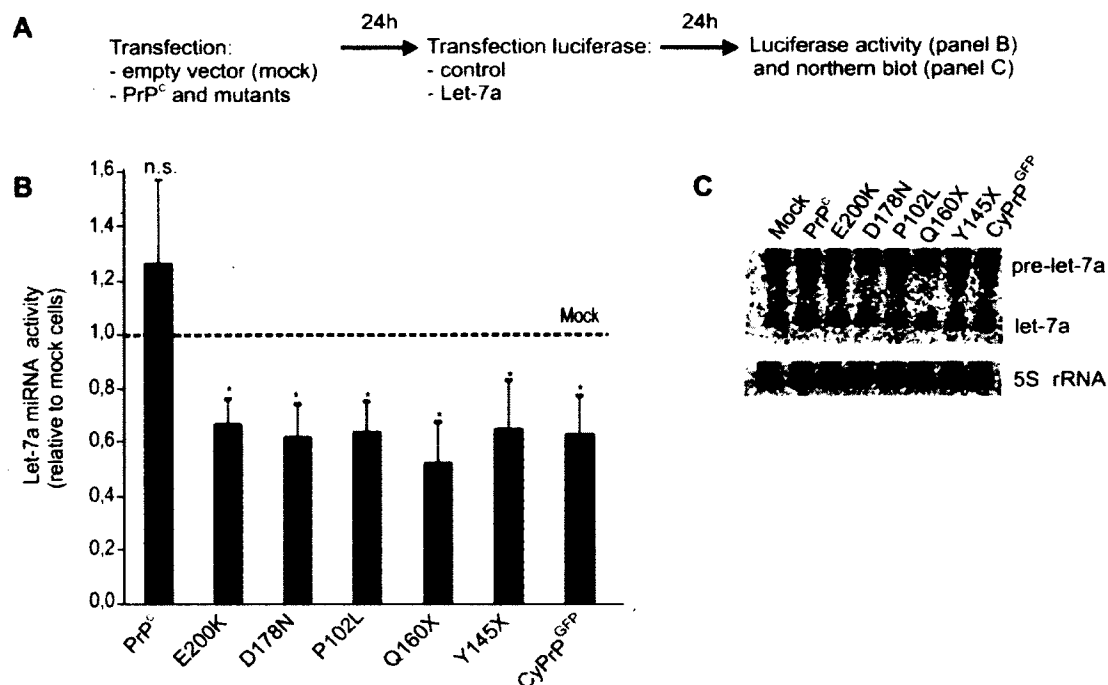
**Figure S3: Efficient miRNA activity is dependent on the OR of PrP<sup>C</sup> in HeLa cells.**

**(A)** Diagram of Renilla luciferase (RLuc) and Firefly luciferase (FLuc) activity reporters. RLuc activity is normalized to FLuc activity. The let-7a miRNA activity is determined by the ratio of normalized RLuc activity from a construct with two let-7a target sites in the 3'UTR to the normalized RLuc activity from a construct with no let-7a target sites in the 3'UTR. **(B)** Diagram of the experimental design for panels C-D. **(C)** The let-7a miRNA activity (let-7a RLuc / RLuc) was determined in HeLa cells treated with a control siRNA or PrP<sup>C</sup> siRNA-6. After 24 h, cells were either transfected with empty vector (PrP<sup>C</sup> siRNA-6), a vector expressing PrP<sup>C</sup> (rescue PrP<sup>C</sup>) or a vector expressing PrP<sup>ΔOR</sup> (rescue PrP<sup>ΔOR</sup>). The let-7a

*miRNA activity is expressed relative to control siRNA. Error bars indicate s.d. (n = 5; student's t-test \*P < 0,001; \*\*P = 0,02; One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method P < 0,001). (D) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown and rescue in HeLa cells. Note that a long exposure time was required to detect endogenous PrP<sup>C</sup> expression and knockdown compared to PrP<sup>C</sup> knockdown rescued with PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>ΔOR</sup>. Actin was used as a loading control. A representative experiment from n = 5 is shown. Densitometric analyses indicated that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 13% with siRNA-6, as indicated below the blots (s.d. = 3; student's t-test P < 0,001). (E) Diagram of the experimental design for panels F-G. (F) HeLa cells were treated with a control siRNA or shRNA, or PrP<sup>C</sup> siRNA-1, siRNA-7 or shRNA. The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA or shRNA.. Error bars indicate s.d. (n = 3; student's t-test \*P < 0,001, and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method P < 0,001). (G) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown with siRNA-1, siRNA-7 and the shRNA. Densitometric analyses indicated that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 6% (siRNA-1), 5% (siRNA-7), and 20% (shRNA) as indicated below the blots (n = 5; s.d. = 2 for siRNA-1; s.d. = 3 for siRNA-7; s.d. = 13 for shRNA; student's t-test P < 0,001).*

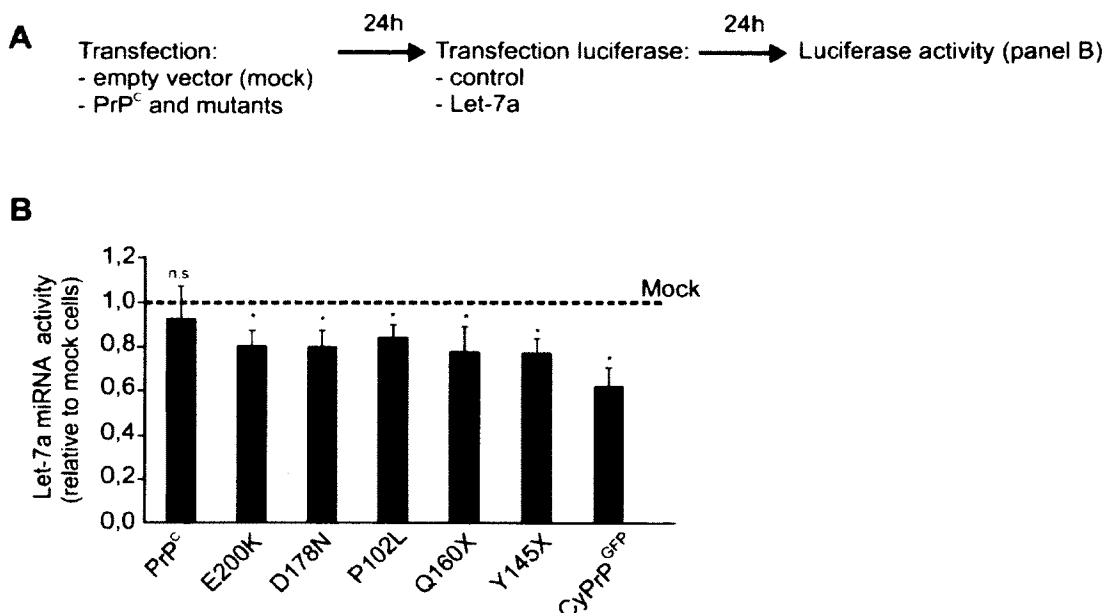
### **PrP<sup>C</sup> familial mutants and CyPrP, an artificial mutant, inhibit miRNA activity**

We then investigated if PrP<sup>C</sup> familial mutations could interfere with the ability of PrP<sup>C</sup> to promote miRNA activity (Fig. 3A). If mutations affect the ability of PrP<sup>C</sup> to promote miRNA-mediated repression, cells expressing familial mutants would be expected to display a miRNA activity similar to mock-transfected cells. Unexpectedly, we observed that all tested PrP<sup>C</sup> familial mutants significantly inhibit miRNA activity in HEK293 and HeLa cells as opposed to PrP<sup>C</sup> (Figs 3B, S4). Neither overexpression of PrP<sup>C</sup> nor PrP<sup>C</sup> mutants affect the levels of pre-let-7a or mature let-7a, suggesting that the observed reduction in silencing activity was not due to alterations in the miRNA maturation (Fig. 3C). CyPrP, an artificial mutant that accumulates in the cytosol of transfected cells also significantly reduced miRNA activity without altering miRNA processing.



**Figure 3: PrP<sup>C</sup> familial mutants and CyPrP, an artificial mutant, inhibit miRNA activity.**

(A) Diagram of the experimental design. (B) miRNA activity was determined as described in Fig. 2A, and normalized with mock-transfected HEK293 cells expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup> (Mock; dotted line). Errors bars indicate s.d. (n = 4; Paired t-test \*P < 0,05 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method P < 0,001, validated for comparison to Mock and PrP<sup>C</sup> overexpression). n.s., not significant. (C) Northern blot analysis confirms that PrP mutants and PrP<sup>C</sup> do not affect let-7a miRNA processing.



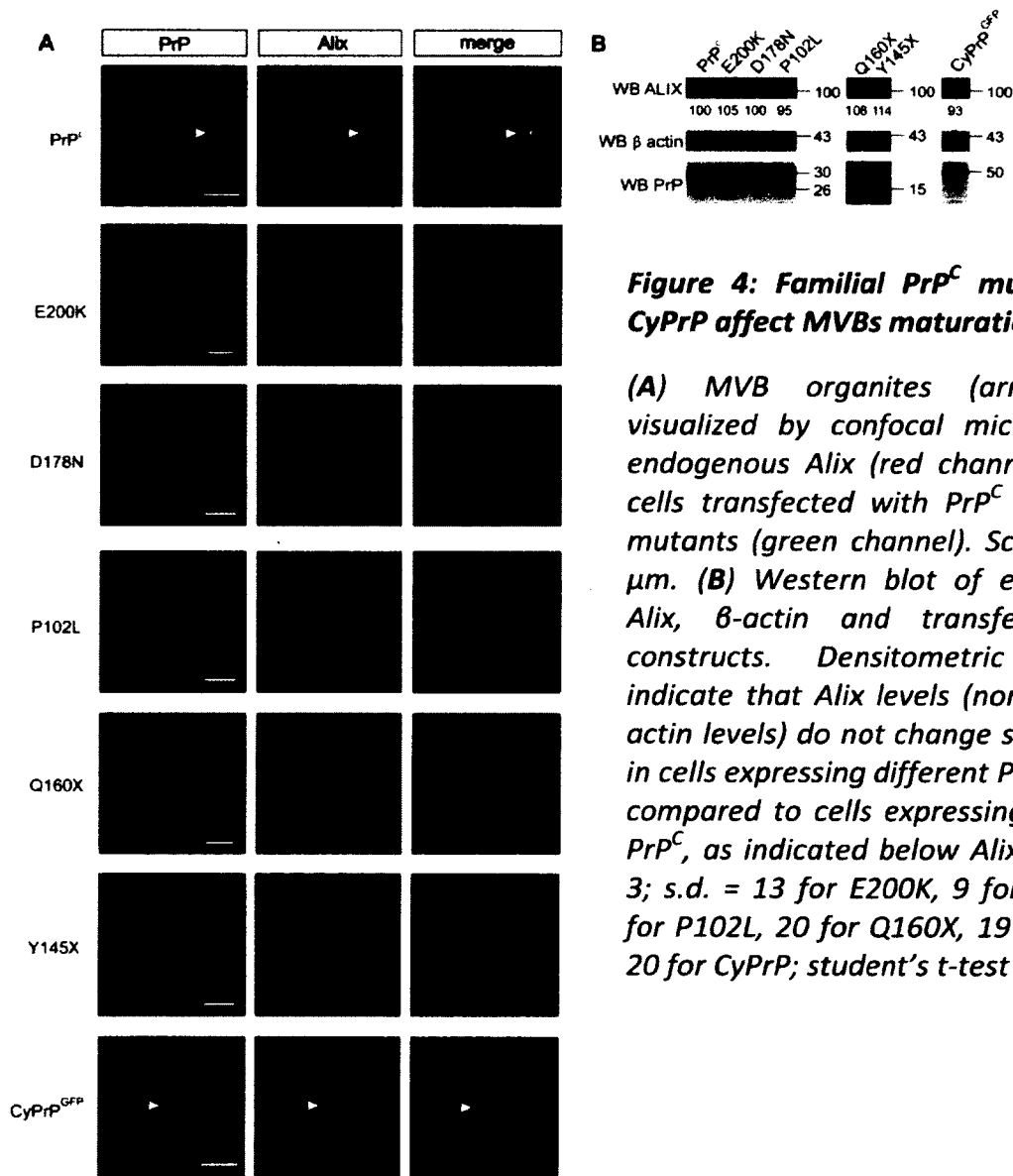
**Figure S4: Familial PrP<sup>C</sup> mutants decrease let-7a miRNA activity in HeLa cells.**

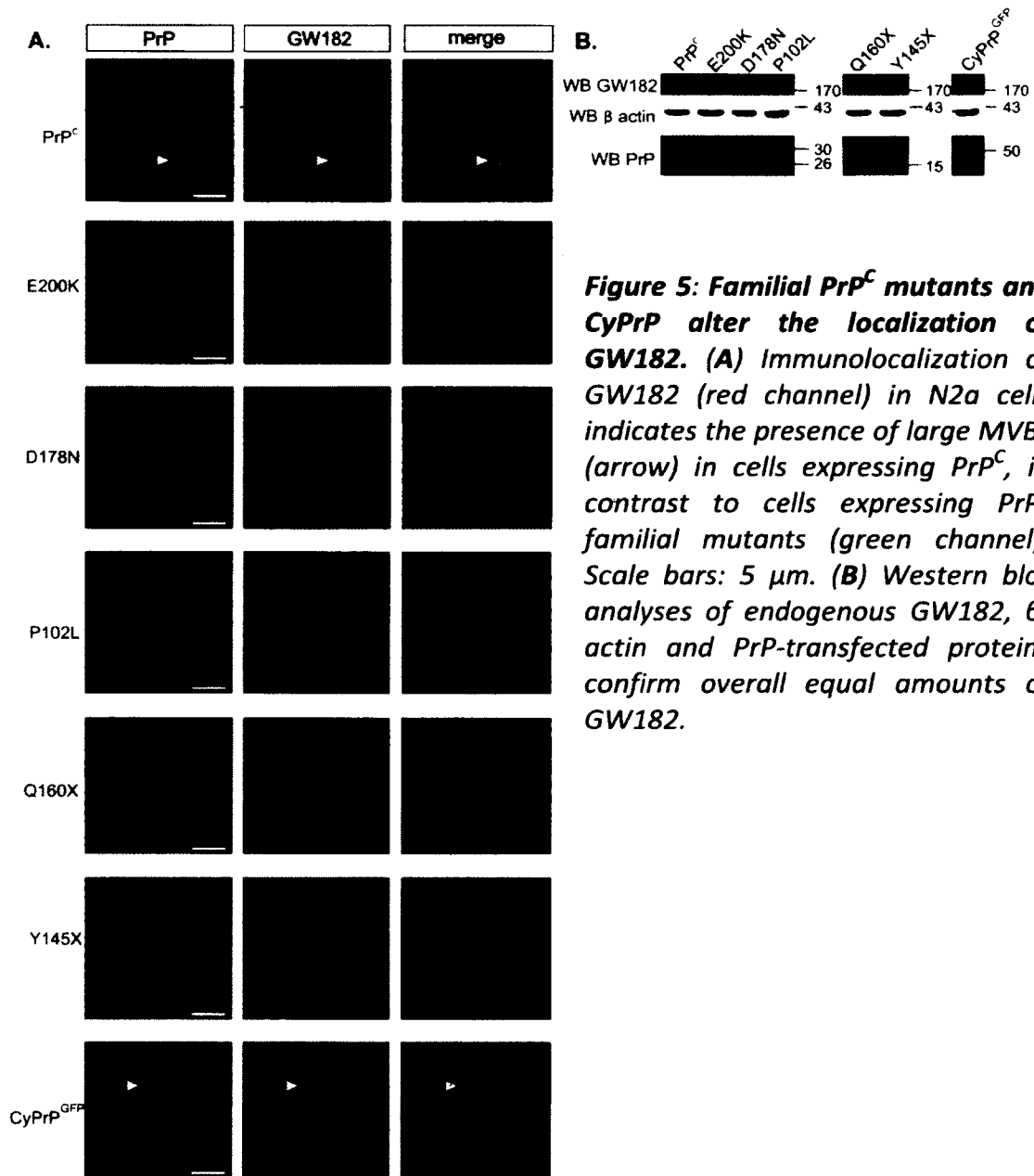
(A) Diagram of the experimental design. (B) Let-7a miRNA activity was determined as described in Fig. 2A, and normalized with mock-transfected cells expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup> (Mock; dotted line). Errors bars indicate s.d. ( $n = 4$ ; Paired t-test  $*P = 0,029$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $*P < 0,001$ , validated for comparison to Mock and PrP<sup>C</sup> overexpression). n.s., not significant.

### Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect the maturation of MVBs

A key result consistent with the implication of MVBs in RNA silencing is the observation that knockdown of Alix, a protein involved in MVBs maturation, results in decreased RNA silencing (Gibbins et al., 2009). Since PrP<sup>C</sup> mutants inhibit miRNA activity, we tested for possible defects in MVBs assembly. First, MVBs were detected by immunofluorescence using antibodies against Alix. Cells expressing PrP<sup>C</sup> mutants had less, smaller or undetectable Alix-positive MVB-like organites in their cytosol compared to PrP<sup>C</sup>-expressing cells (Fig. 4A). Quantification of Alix levels did not show any significant change in cells transfected with PrP mutants, indicating that Alix likely had relocalized to non-MVBs compartments (Fig. 4B). Second, since GW182 associates with MVBs, we probed GW182 localization in cells expressing PrP<sup>C</sup> familial mutants by immunofluorescence. In cells

expressing PrP<sup>C</sup>, we observed a typical distribution of GW182 in large MVBs (Fig. 5A). In contrast, GW182 staining did not reveal typical MVB-like organites in cells expressing PrP<sup>C</sup> mutants (Fig. 5A). Similar to Alix, levels of GW182 did not change in cells expressing familial mutants (Fig. 5B), indicating that GW182 likely relocates to the cytosol. In contrast to familial mutants, CyPrP aggregates sequestered Alix and GW182 in the cytoplasm (Figs 4A, 5A). This sequestration likely explains how this mutant affects miRISC activity.

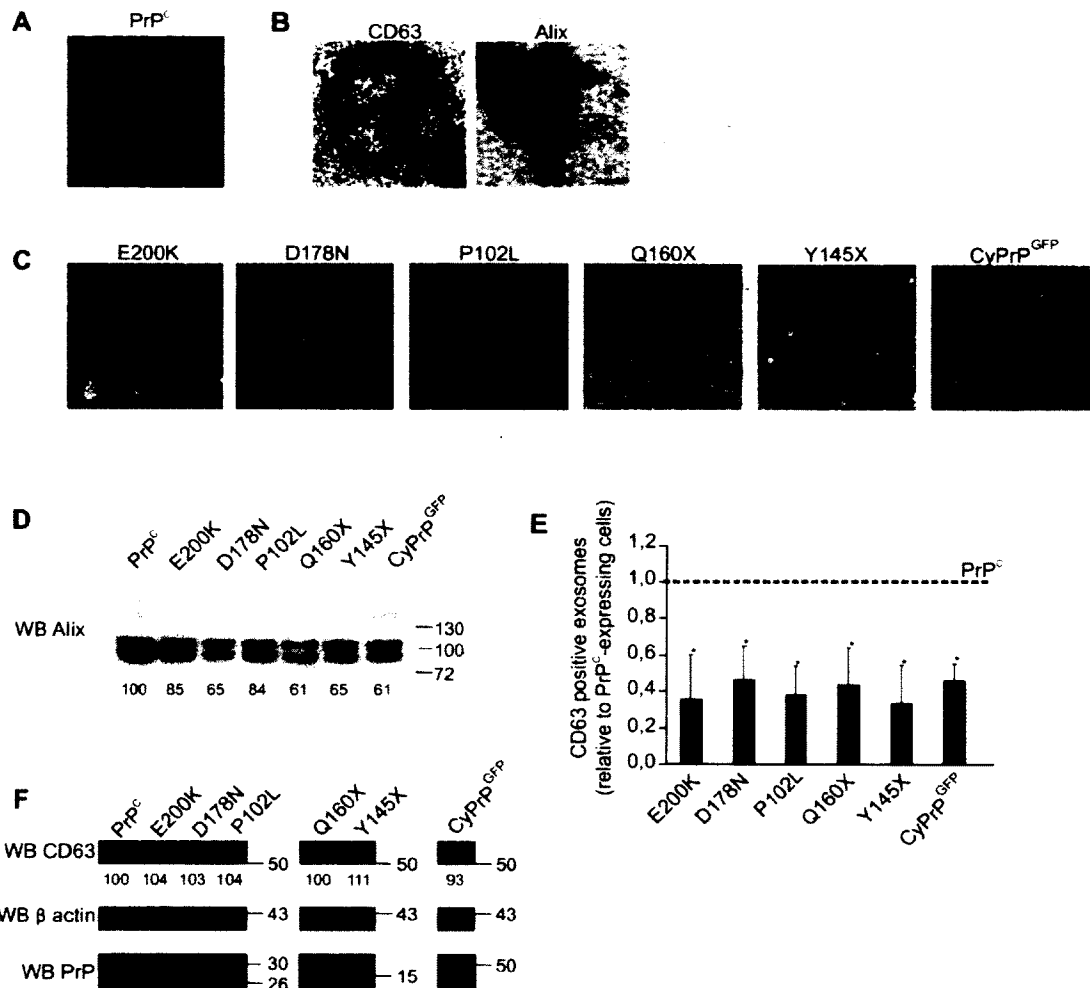






### **PrP<sup>C</sup> familial mutants affect secreted exosomes**

MVBs are sites of exosome biogenesis and their inadequate maturation is known to affect exosome production (Hurley & Odorizzi, 2012; MacDonald et al., 2012). To assess the effect of PrP familial mutants on the exosomes, we purified exosomes from supernatants of cells expressing either wild-type PrP<sup>C</sup> or familial mutants. We then characterized the purified material by electron microscopy with or without immunogold labelling (Fig 6A-C) and we could find exosomes with similar appearance, although apparently less in number for cells expressing the familial mutants. Therefore, we aimed at characterizing purified exosomes either by western blots of Alix (Fig. 6D) or by ELISA of CD63 (Fig. 6E) of the samples. Indeed, we found by both methods that familial mutants expression induces a decrease in positive CD63 and Alix exosomes, probably caused by the delocalization of Alix, which is essential to form intraluminal vesicles in MVB which include exosomes (Baietti et al., 2012; Hurley & Odorizzi, 2012). We show in Fig 6F that familial mutants do not affect significantly the level of intracellular CD63 protein. Altogether, these results confirm that PrP mutants alter MVBs maturation and exosomes production.



**Figure 6: Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect secreted exosomes.**

**(A)** Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells transfected with PrP<sup>C</sup>. Scale bar, 100 nm. **(B)** Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells transfected with PrP<sup>C</sup> with immunogold labelling against CD63 or Alix. Scale bar, 20 nm. **(C)** Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells expressing different PrP mutants. Scale bar, 100 nm. **(D)** Western blot of Alix on purified exosomes from cells transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP mutants. Densitometric analyses show that Alix levels in exosomes preparation from PrP mutants expressing cells were reduced, as indicated below the blot ( $n = 4$ ;  $s.d. = 0,15$  for E200K,  $0,21$  for D178N,  $0,19$  for P102L,  $0,14$  for Q160X,  $0,12$  for Y145X,  $0,11$  for CyPrP; One Way RM ANOVA Holm-sidak method  $P = 0,025$  for E200K and P102L and  $P < 0,001$  for D178N, Q160X, Y145X and CyPrP. **(E)** Exosomes production quantified by ELISA of CD63 on purified exosomes from HEK293 cells transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP mutants. Results are expressed as relative to exosomes secreted by PrP<sup>C</sup>-expressing cells (dotted line). Errors bars indicate  $s.d.$  ( $n = 3$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test  $*P = 0,002$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method

*P* < 0,001 for all mutants). (F) Western blot analyses of cellular CD63,  $\beta$ -actin and transfected PrP<sup>C</sup> constructs. Densitometric analyses (relative to actin levels) indicate that CD63 cellular levels do not change significantly in cells expressing different PrP mutants compared to cells expressing wild-type PrP<sup>C</sup>, as indicated below CD63 blots (*n* = 3; s.d. = 21 for E200K, 28 for D178N, 6 for P102L, 9 for Q160X, 13 for Y145X, 20 for CyPrP; student's *t*-test *P* > 0.05).

## DISCUSSION

Diverse functions were attributed to PrP<sup>C</sup> as a modulator of cell proliferation and differentiation, and many of those are tightly regulated by miRNA, in particular by let-7a (Bremer et al., 2010; Peralta et al., 2011; Stella et al., 2010; Zhang et al., 2007). Previous studies showed that PrP<sup>C</sup> interacts with many RNA-binding proteins implicated in diverse pathways of the mRNA decay (Zafar et al., 2011; Spielhauer & Schatzl, 2001; Satoh et al., 2009). Recently, PrP<sup>C</sup> was proposed to be a new positive regulator of miRNA activity by promoting the formation of mature miRISC (Ago-GW182-miRNA complex) via the GWG motif present in PrP<sup>C</sup> OR region (Gibbins et al., 2012). Here, we confirmed that PrP<sup>C</sup> interacts with Ago2 and GW182 in MVBs and increases miRNA activity. Moreover, we demonstrated that the OR domain is essential for these activities. Therefore, our results add to the hypothesis of PrP<sup>C</sup> being a novel representative of the GWG proteins family known to be crucial for maintaining high miRNA activity. Interestingly, several diseases are related to both PrP<sup>C</sup> and miRNA deregulation such as cancer (Antony et al., 2012; Jansson & Lund, 2012), Alzheimer's (Alier et al., 2011; Lukiw et al., 2012; Um et al., 2012) and prion diseases (Bellingham et al., 2012; Montag et al., 2012). It would be interesting to investigate if the known but yet misunderstood implication of PrP<sup>C</sup> and miRNA activity in these diseases and metastasis process involves the novel PrP<sup>C</sup>-mediated modulation of the miRNA pathway elucidated here.

TSEs were suggested to be linked with a deregulation of the endolysosomal system (ELS), such as accumulation and enlargement of early endosomes and alteration of lysosomes biogenesis (Coleman et al., 2012; Kovacs et al., 2007; Ashok & Hegde, 2009). Recently, two studies revealed a deregulation of some Rab proteins activity in TSEs (Gawinecka et al., 2012; Massignan et al., 2010; Zafar et al., 2011). These proteins are important for the maturation of ELS. Furthermore, CyPrP and some familial PrP<sup>C</sup> mutants inhibit Mahogunin, an ubiquitin ligase which is important for sorting proteins to MVBs, resulting in defects in the maturation of endosomes to MVBs (Aguzzi & Steele, 2009; Chakrabarti & Hegde,

2009). Interestingly, the maturation of the ELS is crucial to maintain a normal miRNA activity (Gibbings & Voinnet, 2010; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009), and regulation of miRISC is related to neuronal cells homeostasis because of its involvement in diverse processes, including neuronal development, plasticity, synaptic activity, cells survival and death (Shah et al., 2010; Goff et al., 2009). Here, we show that PrP<sup>C</sup> mutants affect miRNA activity, cause delocalization of Alix and GW182 from MVB-like organites and modify exosomes production. We propose that Alix and GW182 delocalization in non-MVB compartment affects MVB maturation which explains the miRNA activity inhibition related to PrP<sup>C</sup> familial mutants expression. This mechanism may contribute to the neurodegeneration observed in familial TSEs. In a series of elegant studies, exosomes released from prion-infected neuronal cells were shown to have distinct features compared to non-infected cells. First, exosomes are heterogeneous vesicles with 1, 2 or 3 membranes and the number of triple-membrane exosomes released from prion-infected is reduced at the detriment of single-membrane exosomes (Coleman et al., 2012). Second, exosomes released from prion-infected cells display a distinct miRNA signature (Bellingham et al., 2012). These observations support the hypothesis that misfolding of PrP<sup>C</sup> alters the MVBs-exosomal pathway, as indicated by our study using familial mutants. Several other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases are associated with defects in MVBs (Li et al., 2010; Umeda et al., 2011; Pal et al., 2006; Higashi et al., 2009) and miRNA pathway (Ghose et al., 2011; Lee et al., 2012; Minones-Moyano et al., 2011; Savas et al., 2008). It would be of great interest to determine if ELS maturation and miRNA activity are also affected in these disorders.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the people at the electron microscopy platform at the Faculty of Medicine, University of Sherbrooke. This work was supported by a grant from Canadian Institutes for Health Research to X.R. (MOP -89881). S.B. was supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**REFERENCES**

- Aguzzi A, Steele AD. 2009. Prion topology and toxicity. *Cell* 137:994-996.
- Alier K, Ma L, Yang J, Westaway D, Jhamandas JH. 2011. Abeta inhibition of ionic conductance in mouse basal forebrain neurons is dependent upon the cellular prion protein PrPC. *J Neurosci* 31:16292-16297.
- Antony H, Wiegmans AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL. 2012. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 31:1-19.
- Ashok A, Hegde RS. 2009. Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. *PLoS Pathog* 5:e1000479.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677-685.
- Beaudoin S, Vanderperre B, Grenier C, Tremblay I, Leduc F, Roucou X. 2009. 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. *Biochim Biophys Acta* 1793:335-345.
- Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. 2012. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*.
- Bremer J, O'Connor T, Tiberi C, Rehrauer H, Weis J, Aguzzi A. 2010. Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS One* 5:e12450.
- Castilla-Llorente V, Spraggon L, Okamura M, Naseeruddin S, Adamow M, Qamar S, Liu J. 2012. Mammalian GW220/TNGW1 is essential for the formation of GW/P bodies containing miRISC. *J Cell Biol* 198:529-544.
- Chakrabarti O, Hegde RS. 2009. Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* 137:1136-1147.
- Chekulaeva M, Parker R, Filipowicz W. 2010. The GW/WG repeats of Drosophila GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated repression. *Nucleic Acids Res* 38:6673-6683.
- Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF. 2012. Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *Faseb J* 26:4160-4173.
- El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T. 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily

conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21:2539-2544.

Eulalio A, Triteschler F, Izaurralde E. 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 15:1433-1442.

Gawinecka J, Cardone F, Asif AR, De Pascalis A, Wemheuer WM, Schulz-Schaeffer WJ, Pocchiari M, Zerr I. 2012. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease subtype-specific alterations of the brain proteome: Impact on Rab3a recycling. *Proteomics*.

Ghose J, Sinha M, Das E, Jana NR, Bhattacharyya NP. 2011. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease. *PLoS One* 6:e23837.

Gibbings D, Leblanc P, Jay F, Pontier D, Michel F, Schwab Y, Alais S, Lagrange T, Voinnet O. 2012. Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 19:517-524, S511.

Gibbings D, Voinnet O. 2010. Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends Cell Biol* 20:491-501.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11:1143-1149.

Goff LA, Davila J, Swerdel MR, Moore JC, Cohen RI, Wu H, Sun YE, Hart RP. 2009. Ago2 immunoprecipitation identifies predicted microRNAs in human embryonic stem cells and neural precursors. *PLoS One* 4:e7192.

Goggin K, Beaudoin S, Grenier C, Brown AA, Roucou X. 2008. Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim Biophys Acta* 1783:479-491.

Grenier C, Bissonnette C, Volkov L, Roucou X. 2006. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem* 97:1456-1466.

Higashi S, Moore DJ, Yamamoto R, Minegishi M, Sato K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Emson PC, Wada K, Dawson VL, Dawson TM, Arai H, Iseki E. 2009. Abnormal localization of leucine-rich repeat kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:994-1005.

Hurley JH, Odorizzi G. 2012. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 14:654-655.

Jansson MD, Lund AH. 2012. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*.

- Jodoin J, Laroche-Pierre S, Goodyer CG, LeBlanc AC. 2007. Defective retrotranslocation causes loss of anti-Bax function in human familial prion protein mutants. *J Neurosci* 27:5081-5091.
- Karlowski WM, Zielezinski A, Carrere J, Pontier D, Lagrange T, Cooke R. 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 38:4231-4245.
- Kovacs GG, Gelpi E, Strobel T, Ricken G, Nyengaard JR, Bernheimer H, Budka H. 2007. Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:628-636.
- Kristiansen M, Messenger MJ, Klohn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Tabrizi SJ. 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280:38851-38861.
- Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim JH, Huh JY, Yoon H, Park DK, Lim JY, Kim JM, Jeon D, Ryu H, Lee SK, Kim M, Roh JK. 2012. miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Ann Neurol* 72:269-277.
- Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim do H, Cho IS, Nakahara K, Preall JB, Bellare P, Sontheimer EJ, Carthew RW. 2009. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 11:1150-1156.
- Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Aronin N, Difiglia M. 2010. Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 30:4552-4561.
- Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM, Bhattacharjee S. 2012. Spreading of Alzheimer's disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA. *Neuroreport* 23:621-626.
- MacDonald C, Buchkovich NJ, Stringer DK, Emr SD, Piper RC. 2012. Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Rep* 13:331-338.
- Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C. 2009. Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5:e1000426.
- Massignan T, Biasini E, Lauranzano E, Veglianesi P, Pignataro M, Fioriti L, Harris DA, Salmona M, Chiesa R, Bonetto V. 2010. Mutant prion protein expression is associated with an alteration of the Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDI)/Rab11 pathway. *Mol Cell Proteomics* 9:611-622.
- Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, Marti E. 2011. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 20:3067-3078.



- Mishra RS, Bose S, Gu Y, Li R, Singh N. 2003. Aggresome formation by mutant prion proteins: the unfolding role of proteasomes in familial prion disorders. *J Alzheimers Dis* 5:15-23.
- Montag J, Brameier M, Schmadicke AC, Gilch S, Schatzl HM, Motzkus D. 2012. A genome-wide survey for prion-regulated miRNAs associated with cholesterol homeostasis. *BMC Genomics* 13:486.
- Pal A, Severin F, Lommer B, Shevchenko A, Zerial M. 2006. Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172:605-618.
- Peralta OA, Huckle WR, Eyestone WH. 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 81:68-77.
- Prusiner SB. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.
- Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H. 2009. Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:16-35.
- Savas JN, Makusky A, Ottosen S, Baillat D, Then F, Krainc D, Shiekhhattar R, Markey SP, Tanese N. 2008. Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10820-10825.
- Shah AA, Meese E, Blin N. 2010. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review. *J Appl Genet* 51:501-507.
- Singh A, Isaac AO, Luo X, Mohan ML, Cohen ML, Chen F, Kong Q, Bartz J, Singh N. 2009. Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders. *PLoS Pathog* 5:e1000336.
- Spielhauer C, Schatzl HM. 2001. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276:44604-44612.
- Stella R, Massimino ML, Sandri M, Sorgato MC, Bertoli A. 2010. Cellular prion protein promotes regeneration of adult muscle tissue. *Mol Cell Biol* 30:4864-4876.
- Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S. 2009. Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *Rna* 15:1078-1089.
- Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM. 2012. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15:1227-1235.

Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, Mori H. 2011. Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 89:1031-1042.

Wadsworth JD, Collinge J. 2007. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:598-609.

Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, Hooper NM. 2012 Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun* 3:1134.

Zafar S, von Ahsen N, Oellerich M, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Armstrong VW, Asif AR. 2011. Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *J Proteome Res* 10:3123-3135.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302:1-12.

## **RÉSULTATS**

### **Chapitre 2:**

**LES FORMES MAL REPLIÉES DE PrP<sup>C</sup> INHIBENT LA FORMATION DE DEUX TYPES DE GRANULES D'ARN, LES GRANULES DE STRESS ET LES P-BODIES, CE QUI AUGMENTE LA SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES AUX STRESS CELLULAIRES**

Simon Beaudoin, Xavier Roucou

Article en rédaction

#### **CONTRIBUTIONS :**

J'ai fait 100% des expériences, l'analyse de tous mes résultats et j'ai écrit le manuscrit sous la supervision de mon directeur de recherche et une assistante de recherche.

## INTRODUCTION

La protéine prion cellulaire ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) est impliquée dans la réponse à différents stress cellulaires tels que le stress oxydatif, au réticulum endoplasmique et thermique, mais sa fonction exacte demeure imprécise. De plus, plusieurs études suggèrent que la toxicité reliée aux formes pathologiques de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  serait due à une dérégulation de la réponse au stress (Goggin et al, 2008, Paquet et al, 2009, Moreno et al, 2012, Roffe et al, 2010). Ces études récentes ont démontré que certaines formes pathologiques de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  induisent l'activation de la réponse au stress  $\text{eIF2}\alpha$  dépendante et que cette activation est une étape déterminante pour le développement de la pathologie, en particulier au niveau de la mort des cellules neuronales. Cependant, il est bien connu que l'activation de la réponse au stress  $\text{eIF2}\alpha$  dépendante favorise normalement la survie cellulaire via l'inhibition de la traduction des ARNm non essentiels à la survie cellulaire, la formation des granules de stress (GSs) et à la synthèse des protéines *Heat Shock* (section 4. p51). Les GSs sont des sites d'entreposage et de triage des ARNm et sont nécessaires à la survie cellulaire puisqu'elles séquestrent certains facteurs pro-apoptotiques (Arimoto et al, 2008, Kim et al, 2005, Thomas et al, 2011, Tsai & Wei, 2010, Yoneda et al, 2001). Mon second objectif de mon doctorat est d'approfondir le rôle de la réponse au stress, en particulier de la formation des GSs, dans la neurotoxicité reliée aux ESTs et d'investiguer un lien possible entre la dérégulation de la réponse au stress et du système ARNi. Pour cette partie de mes travaux, j'ai utilisé différents modèles cellulaires afin d'étudier la neurotoxicité observée dans les ESTs, c'est-à-dire un modèle de surexpression des mutants familiaux de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et du mutant artificiel  $\text{CyPrP}$  et un modèle d'infection par l'agent infectieux prion nommé *PrP scrapie*. J'ai démontré que la surexpression des mutants de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  induit l'expression de la protéine PACT qui est responsable de l'activation de la kinase de stress PKR et de la phosphorylation d' $\text{eIF2}\alpha$ . Cependant, j'ai démontré que les mutants de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  inhibent la formation des GSs suite à un stress cellulaire augmentant la susceptibilité des cellules aux différents stress cellulaires. Il est connu que les GSs sont étroitement associées aux P-Bodies, sites de dégradation et de stockage des ARNm. Certaines études suggèrent que les P-Bodies influencent ou sont nécessaires à la

formation des GSs (Buchan et al, 2008, Moser & Fritzler, 2013, Nonhoff et al, 2007). De plus, une étude récente a suggéré que PrP<sup>C</sup> stabilise l'association des P-Bodies avec la membrane des MVBs (Gibbins et al, 2012). Dans cette étude, j'ai démontré que PrP<sup>C</sup> pouvait s'associer aux P-Bodies via son domaine OR et qu'il favorise l'association d'Ago2 avec les P-Bodies suggérant un échange possible entre le RISC associé aux MVBs et les P-Bodies. J'ai ensuite testé l'effet des mutants de PrP<sup>C</sup> sur la formation des P-Bodies. Mes résultats démontrent que tous les mutants de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des P-Bodies ce qui contribuerait à la diminution de l'efficacité des miARN observée dans mon étude précédente et à l'augmentation de l'activité ARNi. J'ai confirmé l'inhibition des P-Bodies et des GSs dans le modèle cellulaire d'infection par PrP<sup>Sc</sup> ce qui suggère que la dérégulation des P-Bodies et des GSs serait un mécanisme général de neurotoxicité des ESTs. Je propose que le maintien de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'inhibition des GSs et des P-Bodies contribuent à la dérégulation du système d'ARNi, à la susceptibilité des neurones et à la neurodégénérescence observée dans les ESTs.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Anticorps et clonages

Les anticorps primaires utilisés sont les monoclonaux anti-GFP (clone B-2, SantaCruz biotechnology, WB 1/1000), anti-PrP (clone 3F4, Chemicon, WB et IF 1/1000; Saf32, Cayman, WB 1/1000,) anti- $\beta$ -actin (A5441, Sigma-Aldrich, WB 1/10000), anti-Dcp1a (clone 3G4, Abnova, WB 1/500, IF 1/100, IP 1/200), anti-Dicer (clone 13D6, Abcam, IF 1/100), anti-hnRNPA1 (clone 4B10, Abcam, IF 1/500) , anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (clone E90, Abcam, WB 1/500, IF 1/100) et les anticorps polyclonaux anti-eIF2 $\alpha$  (FL-135, SantaCruz biotechnology, WB 1/500), anti-PKR (clone B-10, SantaCruz biotechnologie, WB 1/500), anti-phospho PKR Thr-446 (clone E120, Abcam, WB 1/1000), anti-PACT (Abnova, WB 1 $\mu$ g/ml, IP 5 $\mu$ g/ml), anti-TIAR (clone 6, Pharmingen, IF 1/500), anti-TIA1 (clone D9, SantaCruz biotechnologie, 1/200), anti-Ago2 (ab32381, Abcam, WB 2 $\mu$ g/ml, IP 5 $\mu$ g/ml), anti-GW182 (ab87541, Abcam, IF 1/500), anti-DDX6 (40684, Abcam, WB 1/1000, IF 1/100) et anti-PABP (H-300, SantaCruz biotechnology, 1/250). Les anticorps secondaires utilisés pour les immunofluorescence sont l'Alexa Fluor 488 ou 633 anti-mouse (Amersham Biosciences, 1/1000) et l'Alexa Fluor 568 anti-rabbit (Amersham Biosciences, 1/1000). Pour les westerns blots, les anticorps secondaire sont anti-mouse-HRP et anti-rabbit-HRP (GE Healthcare Life Sciences, 1/5000). Les différents clonages ont été décrits précédemment (article 1, section *materials and methods* et *Table suppl.1*).

### Culture, traitement et transfection des cellules

Les lignées cellulaires suivantes ont été maintenues dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco plus 10% de sérum de veau fœtal et avec l'ajout d'acides aminés non essentiels (Wisent, Montréal, QC, CA) : les neuroblastomes de souris N2a, les cellules embryonnaires humaines HEK293 du rein, les cellules HeLa du col de l'utérus, les cellules neurogliales MOV de souris exprimant le PrP<sup>C</sup> ovin et les cellules MOVs infectées par la souche 127S du PrP<sup>Sc</sup> d'origine ovine. Les cellules ont été stressées au stress oxydatif (0,5mM arsénique de sodium, 30 min) et/ou un choc thermique (42°C, 1h) comme décrit dans un précédent

article (Goggin et al, 2008). Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules N2a et HEK293 ont étéensemencées à  $1 \times 10^5$  cellules / puits dans des plaques à 24 puits et ont été transfectées avec le réactif de transfection GeneCellin (BioCellChallenge, Toulon cedex 9, France), conformément aux instructions du fabricant.

Pour les expériences de knock-down de PrP<sup>C</sup>, les cellules HeLa ont étéensemencées à  $5 \times 10^4$  cellules / puits dans des plaques à 24 puits ont été transfectées avec 100 nM du siARN PrP<sup>C</sup> (Ambion, SI03019324) ou du siARN contrôle négatif (Promega, AM4611). Les transfections ont été réalisées avec Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, CA) selon le protocole du fabricant. Pour les WB, 48 h après la transfection des siARN, les cellules sont lysées et analysées par WB. Pour l'activité siARN, après 24 h de transfection des siARN PrP<sup>C</sup> et contrôle négatif, les cellules ont été co-transfectées avec le plasmide pGL3 (firefly luciférase) et pRL-TK (rénilla luciférase) au rapport molaire égal avec GeneCellin. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 100 nm du siARN firefly (Promega, AM4629) ou du siARN contrôle négatif (Promega, AM4611).

Pour les mesures d'activité siARN avec les mutants de PrP<sup>C</sup>, les cellules HeLa ont étéensemencées à  $5 \times 10^4$  cellules / puits dans des plaques à 24 puits ont été transfectées avec les mutants PrP<sup>C</sup> ou PrP<sup>C</sup> en utilisant l'agent de transfection GeneCellin. Après 24 h, les cellules ont été co-transfectées avec les plasmides pGL3 (firefly luciférase) et pRL-TK (rénilla luciférase). Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 100 nm du siRNA firefly (Promega, AM4629) ou du siARN contrôle négatif (Promega, AM4611).

#### Immunofluorescence, et hybridation in situ avec sonde fluorescente

Les cellules cultivées sur des lamelles ont été fixées au paraformaldéhyde 4% et traitées pour l'immunofluorescence comme décrit précédemment (article 1, section *materials and methods*). Pour coloration *in situ*, les cellules perméabilisées ont été incubées pendant 10 min avec 2 x SSC (0,3M NaCl and 30mM sodium citrate pH 7.0) et hybridés avec 1 nM d'une sonde d'oligo-dT biotinylé (50 nucléotides, IDT) pendant une nuit à 40 °C. Après avoir lavé deux fois avec 2 x SSC et une fois avec 0,5 x SSC pendant 10 min, les cellules ont

été équilibrés dans 1 x PBS contenant 1 mg / ml de BSA. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 2 pg / ml de streptavidine marqué à l'Alexa Fluor 633 (Molecular Probes) dans 1 x PBS contenant 1 mg / ml de BSA. Après 1 h d'incubation, les cellules ont été lavées et montées comme précédemment décrit (article 1, section *materials and methods*).

#### Microscopie confocale et analyse d'image

Les cellules ont été examinées avec un microscope confocal à balayage (FV1000, Olympus, Tokyo, Japon) couplée à un microscope inversé avec un objectif à immersion  $\times 63$  d'huile (Olympus). Les échantillons ont été excités par laser à 405 nm (diode laser), 488 nm (40 mW laser argon), 568nm (diode laser) et 633 nm (laser hélium-néon) et les signaux ont été prélevés de manière séquentielle. Des coupes optiques horizontales de 320 x 320 pixels ont été prises en série à des intervalles de 0,5  $\mu\text{m}$  à travers toute l'épaisseur de cellules. Les images ont été acquises à partir de cellules ayant la même taille de chaque condition expérimentale utilisant des paramètres instrumentaux identiques. Les images des coupes (épaisseur) représentant le cytoplasme des cellules ont été fusionnées et des pseudocouleurs ont été attribuées selon les spectres d'émission des fluorochromes et (logiciel FluoView, Olympus) ont été recadrée et assemblées avec le logiciel Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

La quantification de la formation des granules de stress et des P-Bodies représente le pourcentage de cellules ayant plus de 5 granules des stress ou P-bodies dans leur cytoplasme.

#### Dosages luciférase

Les activités luciférases ont été mesurées avec le kit de dosage Reporter Dual-luciferase (Promega, Cambridge, MA, USA), selon le protocole du fabricant en utilisant un luminomètre Glomax 20/20 (Promega, Cambridge, MA, USA), et analyser parallèlement en western blot.



### Immunoprécipitation et Western Blot

Les immunoprécipitations ont été réalisées comme décrit précédemment (Beaudoin et al, 2009). Pour les protéines marquées GFP, le système de GFP immuno-trap ChromoTek (allèle Technology Biotech-innovant, San Diego, CA, USA) a été utilisé. Pour les autres immunoprécipitations, le système de la protéine A / G couplée aux billes d'agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-2003) a été utilisé. Vingt-cinq microgrammes de chaque lysat (10%) ont été chargés sur le gel avec des réactions totales d'immunoprécipitation. Les analyses Western blots ont été réalisées comme décrit précédemment (Goggin et al, 2008).

### Analyses densitométriques et des analyses statistiques

Toutes les analyses densitométriques ont été réalisées avec le logiciel Image J sur un minimum de 3 expériences indépendantes. Toutes les valeurs ont été normalisées avec l'actine ou PKR et sont exprimés en moyenne. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec Sigma Plot 11.0.

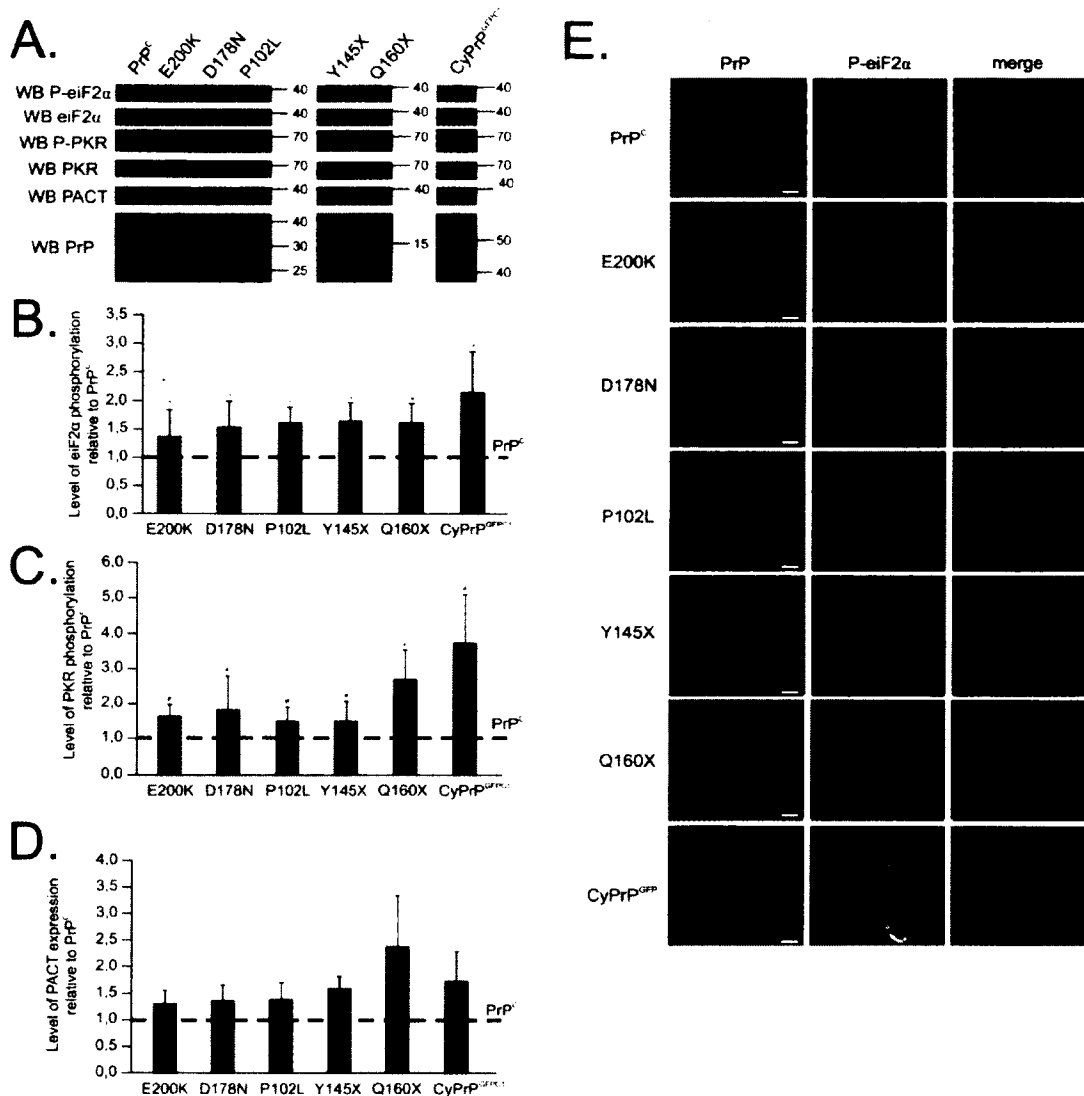
## RÉSULTATS

### **Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ mais inhibent la formation des GSs**

En réponse à divers stress cellulaires environnementaux, les cellules eucaryotes induisent l'arrêt de synthèse générale des protéines par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  à la Ser 51 (eIF2 $\alpha$ -P) ce qui induit également la formation de GSs et la synthèse des protéines essentielles à la survie cellulaire (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009). Les GSs sont connues pour favoriser la survie cellulaire par plusieurs mécanismes (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009). Plusieurs études ont antérieurement montré que le stress cellulaire et la réponse au stress seraient impliqués dans la toxicité des ESTs. Dans une étude précédente, nous avons démontré que CyPrP induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  via l'activation de PKR, mais inhibe l'assemblage de GSs (Goggin et al, 2008)]. Ici, nous avons vérifié si les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> associés soit à la maladie de fCJD (D178N, E200K) ou au syndrome de GSS (P102L, Y145X, Q160X) induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et inhibe la formation des GSs de façon similaire à CyPrP. Pour ce faire, le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  a été déterminé par Western Blot avec l'aide de deux anticorps qui détectent respectivement eIF2 $\alpha$ -P et eIF2 $\alpha$  totale. Le ratio de eIF2 $\alpha$ -P / total eIF2 $\alpha$  a été calculé en quantifiant la densité de chacune des bandes avec le programme ImageJ. Nous avons préalablement démontré que la surexpression PrP<sup>C</sup> n'affecte pas la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Goggin et al, 2008). La figure 1A montre que, par rapport à PrP<sup>C</sup>, tous les mutants familiaux testés induisent significativement la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les cellules N2a et HEK293 (non présenté). La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  a été confirmée par immunofluorescence (Figure 1E). Normalement, eIF2 $\alpha$ -P est localisée dans les GSs. Nous avons plutôt observé un niveau de marquage diffus plus élevé d'eIF2 $\alpha$ -P dans les cellules exprimant les mutants

familiaux ce qui supporte notre hypothèse que comme CyPrP, les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induit un stress cellulaire mais inhibent la formation des GSs (Figure 1E). Peu ou aucun signal n'a été détecté dans les cellules non transfectées et les cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup> (Figure 1E). Ces résultats suggèrent que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induisent un stress cellulaire par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  mais inhibent la formation des GSs.

Quatre kinases de stress peuvent induire la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  à la position Ser51, soit PKR (protéine kinase dépendante de l'ARN), PERK (PKR-like endoplasmique kinase du réticulum), HRI (Heme réglementé inhibiteur) et GCN2 (contrôle général non-derepressible-2) (Wek et al, 2006). Certaines études ont montré que PKR est sous sa forme active dans certaines ESTs (Goggin et al, 2008, Paquet et al, 2009, Roffe et al, 2010), par conséquent, nous avons testé si PKR est activée dans les cellules exprimant les mutants familiaux PrP<sup>C</sup>. Par western blot, nous avons observé que les mutants PrP induisent de façon significative l'activation de PKR par l'utilisation d'anticorps reconnaissant respectivement P-PKR (actif) et PKR totale (Figure 1A) dans les N2a et HEK293 (non présenté). La faible induction de l'activation PKR et la phosphorylation eIF2 $\alpha$  par les mutants familiaux peut être expliquée par le faible niveau d'expression des mutants tronqués (Y145X et Q160X) et l'efficacité des mutations pour induire le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup> puisqu'il est connu que les mutations n'induisent pas à 100% le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup>. PKR est activé par deux mécanismes soit par sa liaison aux ARNdb ou encore par la protéine PACT. Nous avons alors déterminé le niveau d'expression de PACT puisqu'aucun anticorps spécifique contre la forme active de PACT est disponible commercialement. Nous observé que les mutants familiaux augmentent significativement l'expression de PACT ce qui suggère que PKR est activé de façon PACT dépendante (Figure 1A). Ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  via l'activation de la voie PACT/PKR mais inhibent la formation des GSs.



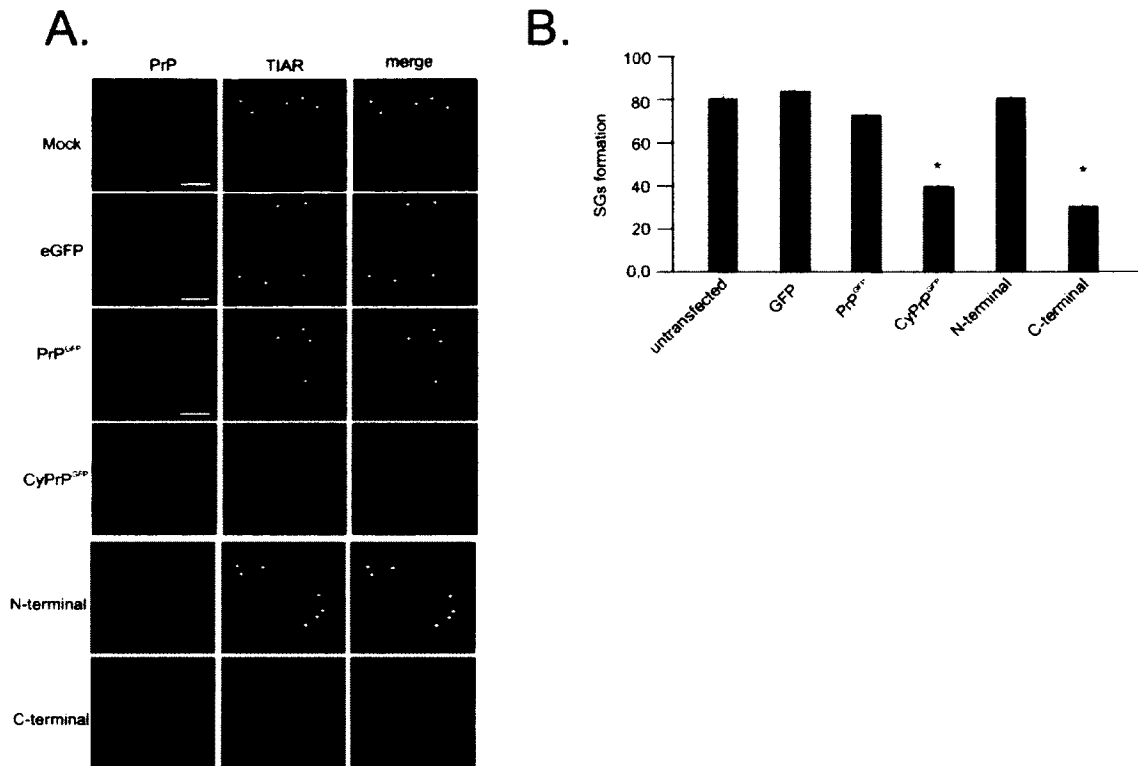
**Figure 1: Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induisent la réponse au stress cellulaire PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  dépendante.**

(A) Les analyses western blot des formes phosphorylées (actives) et totales d'eIF2 $\alpha$  et de PKR révèlent que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> induisent l'activation de la voie PKR/eIF2 $\alpha$  et que les mutants familiaux induisent l'expression de PACT suggérant que les mutants de PrP<sup>C</sup> induisent la réponse au stress cellulaire PACT/PKR/ eIF2 $\alpha$ . La quantification de la densité des bandes a été faite avec le programme ImageJ. Western blot contre PrP est également présenté afin de contrôler la transfection. (B-C) La densité des bandes de P-PKR et P-eIF2 $\alpha$  ont été normalisées respectivement au totale PKR et eIF2 $\alpha$ . L'induction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et de PKR est exprimée en unité relative par rapport à PrP<sup>C</sup>. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (Pour eIF2 $\alpha$ -P/eIF2 $\alpha$  : n=9, Mann-Whitney Rank Sum Test \*P < 0,001 et One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method \*P  $\leq$  0,004 sauf pour E200K \*P = 0,034; Pour P-PKR/PKR : n=6, Mann-Whitney Rank Sum Test \*P = 0,002 et One Way Repeated Measures Analysis of Variance Student-Newman-Keuls Method \*P < 0,05). (D) L'induction de PACT est normalisée par rapport à PKR totale et exprimée en unité

relative par rapport à PrP<sup>C</sup>. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=4; Mann-Whitney Rank Sum Test \*P = 0,029 et One Way Repeated Measures Analysis of Variance Student-Newman-Keuls Method \*P < 0,05). (E) Immunofluorescences et microscopie confocale d'eIF2 $\alpha$  phosphorylée (canal blanc) dans les cellules N2a transfectées avec PrP<sup>C</sup> ou les différents mutants de PrP<sup>C</sup> (canal vert). Noyaux marquée avec du Hoescht (bleu) Barres de grossissement: 10  $\mu$ m.

**Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des GSs suite à un stress cellulaire environnemental indépendamment du niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .**

Afin de confirmer que les mutants familiaux altèrent la formation des GSs de façon similaire à CyPrP, nous avons déterminé si suite à un stress environnemental, les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> peuvent inhiber l'assemblage des GSs. Tout d'abord, nous avons déterminé quel domaine de CyPrP (domaine N-terminal (a.a. 23-124) et domaine C-terminal (a.a. 124-230)) est responsable de l'inhibition de la formation des GSs. La formation des GSs a été contrôlée avec un anticorps dirigé contre la protéine TIAR (TIA-1 receptor), un marqueur des GSs (Figure suppl. 1). Comme on pouvait s'y attendre, dans les conditions non stressées, TIAR est localisée sous forme diffuse dans le cytoplasme et le noyau des cellules N2a (non présenté). Suite au stress thermique, les cellules non transfectées ou exprimant GFP, PrP<sup>GFP</sup> ou le domaine N-terminal de CyPrP<sup>GFP</sup> ont la majorité de la protéine TIAR sous formes d'agrégats cytoplasmiques représentant les granules de stress (Figure suppl. 1). En revanche, l'expression de CyPrP<sup>GFP</sup> et du domaine C-terminal de CyPrP<sup>GFP</sup> inhibent significativement la formation des GSs (Figure suppl. 1). Les mêmes résultats ont été obtenus dans les cellules HEK293 et lors de stress oxydatif (non présentés). Ces résultats indiquent que le domaine C-terminal de CyPrP est impliqué dans l'inhibition des GSs suite à un stress cellulaire environnemental.



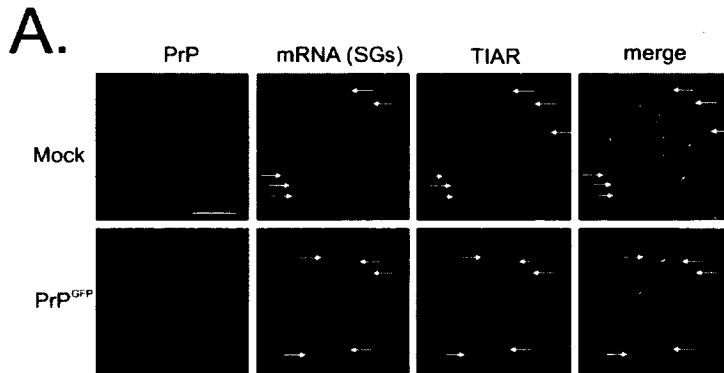
**Figure suppl. 1 : Le domaine C-terminal de CyPrP inhibe la formation des GSs suite à un stress oxydatif.**

**(A)** La formation des GSs suite à un stress thermique a été visualisée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre TIAR (canal rouge) suivie par la microscopie confocale sur des cellules N2a transfectées avec GFP, PrP<sup>GFP</sup>, CyPrP<sup>GFP</sup>, le domaine N-terminal et C-terminal de CyPrP (canal vert). Barres de grossissement: 10 μm.

**(B)** La formation des GSs est quantifiée par le pourcentage de cellules positives pour les GSs (plus de 5 GSs). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3; student's t-test \*P < 0,001 comparées aux cellules non transfectées, transfectées avec GFP ou PrP<sup>GFP</sup> et One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method \*P < 0,001).

Deuxièmement, nous avons déterminé si les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> interfèrent avec l'assemblage des GSs comme le fait CyPrP. Nous avons utilisé l'hybridation in situ avec une sonde oligo-dT fluorescente (FISH) et la microscopie confocale pour visualiser les ARN poly (A) donc les ARNm qui se retrouvent dans les GSs. Afin de confirmer la validité du marquage des GSs par cette technique, nous avons procédé à un double marquage des GSs soit avec la technique FISH et une immunofluorescence contre la protéine TIAR sur des cellules N2a non transfectées ou transfectées avec PrP<sup>GFP</sup>. Nous pouvons observer

suite au stress thermique, une colocalisation granulaire entre les ARNm et TIAR confirmant la validité de la technique FISH pour marquer les GSs (Figure suppl. 2).

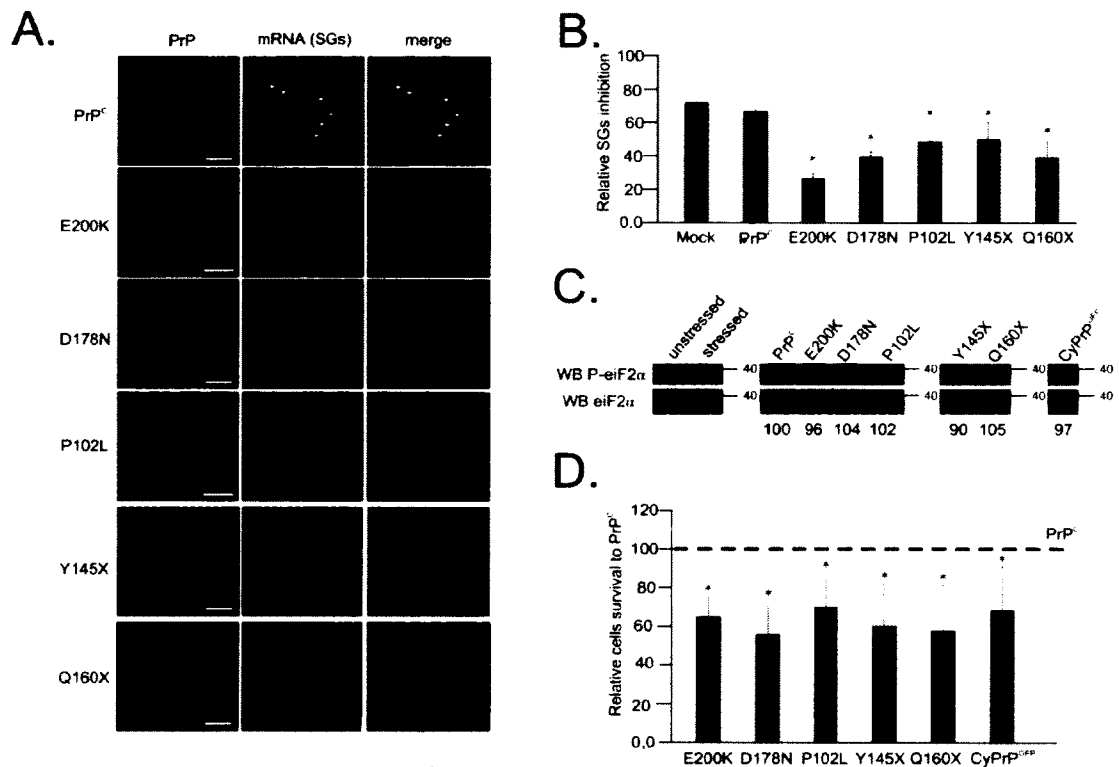


**Figure suppl. 2 : Colocalisation entre les ARNm et TIAR aux GSs.**

**(A)** La formation des GSs suite à un stress thermique a été visualisée par double marquage soit les ARNm à l'aide de la technique FISH avec sonde oligo (dT) (canal blanc) et un marquage par immunofluorescence de TIAR à l'aide d'anticorps contre TIAR (canal rouge) suivi par la microscopie confocale sur des cellules N2a non transfectées ou transfectées avec PrP<sup>GFP</sup>. Barres de grossissement: 10  $\mu$ m.

Par la suite, la technique FISH a été utilisée pour procéder à l'analyse de l'effet des mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> sur la formation des GSs. Les cellules N2a ont été transfectées avec les mutants familiaux et PrP<sup>C</sup> et CyPrP<sup>GFP</sup> (Figure 2 et suppl. 1). Ces derniers ont été utilisés respectivement comme contrôle négatif et positif de l'inhibition des GSs. Comme attendu, comparativement aux cellules non transfectées, les cellules exprimant PrP<sup>C</sup> conservent leur capacité à former des GSs suite au stress thermique, cependant tous les mutants familiaux testés inhibent partiellement mais significativement la formation des GSs de façon similaire à CyPrP (Figure 2A-B). Les mêmes résultats ont été obtenus suite à stress oxydatif et dans les cellules HEK293 (non présentés). Par conséquent, nous avons vérifié si les mutants familiaux affectent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  suite aux stress cellulaires. La figure 2C montre que les mutants familiaux n'ont aucun effet sur la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  suite à un stress thermique. Globalement, ces résultats suggèrent que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des GSs indépendamment de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Nous avons également étudié les conséquences de l'inhibition

des GSs sur la survie cellulaire par des essais d'activité mitochondriale (XTT). La figure 2D montre que les cellules exprimant les mutants de PrP<sup>C</sup> sont plus sensibles à la mort cellulaire que les cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup>. Ces résultats suggèrent fortement que, suite à un stress environnemental, les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des GSs indépendamment de la phosphorylation eiF2 $\alpha$  ce qui augmente la sensibilité des cellules à la mort cellulaire suite à un stress cellulaire environnemental.



**Figure 2: Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des GSs suite à un stress cellulaire indépendamment de la phosphorylation d'eiF2 $\alpha$ .**

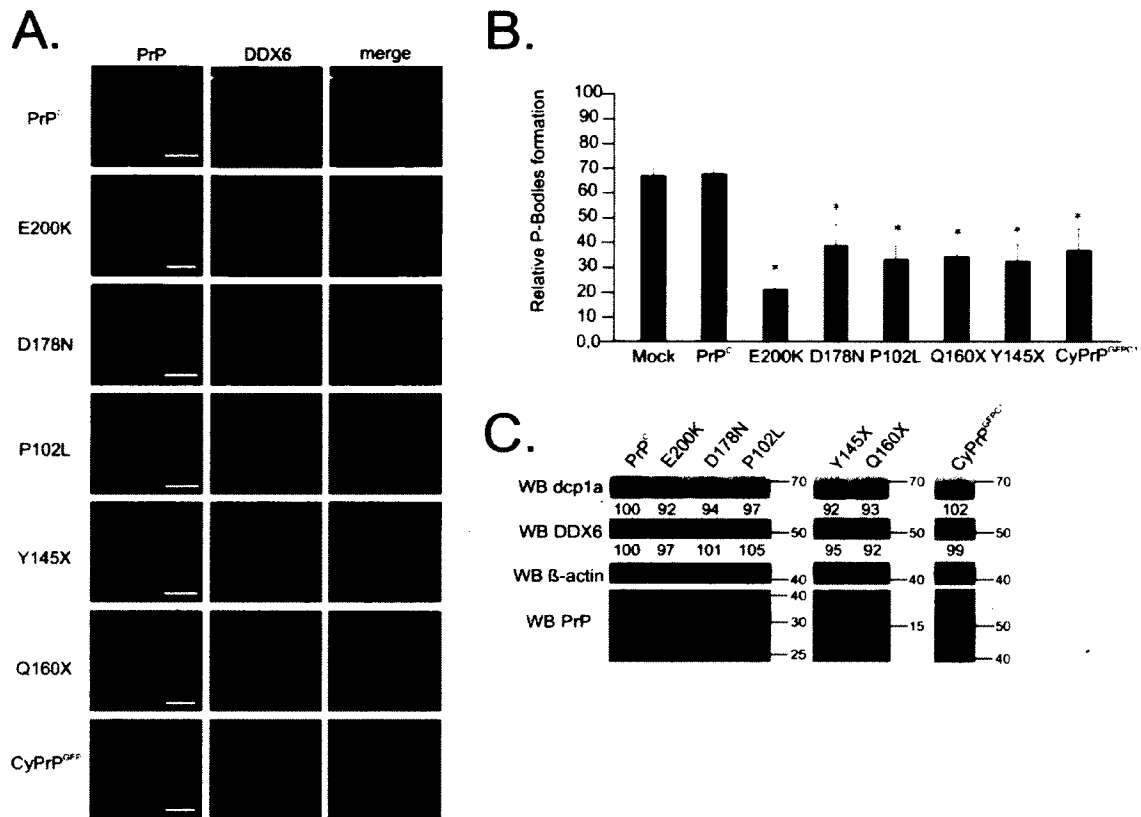
**(A)** La formation des GSs suite à un stress thermique (42°C, 1h) a été visualisée par hybridation *in situ* avec une sonde d'oligo (dT) fluorescente détectant les ARNm poly (A) (canal rouge) et d'une immunofluorescence à l'aide d'anticorps contre PrP suivi de la microscopie confocale sur des cellules N2a transfectées avec PrP<sup>C</sup> ou les mutants de PrP<sup>C</sup> (canal vert). Barres de grossissement: 10  $\mu$ m. **(B)** L'inhibition des GSs est quantifiée comme le pourcentage de cellules positives pour les GSs (plus de 5 GSs). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ( $n=4$ ; student's t-test \* $P < 0,001$  comparées aux cellules non transfectées ou transfectées avec PrP<sup>C</sup> et One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method \* $P < 0,001$ ). **(C)** L'induction de la phosphorylation d'eiF2 $\alpha$  suite au stress thermique dans les cellules N2a a été contrôlé (gauche, unstressed vs stressed). L'effet des mutants de PrP<sup>C</sup> sur la phosphorylation d'eiF2 $\alpha$  suite à un stress thermique est représenté



par le western blot et les valeurs de densitométrie qui sont relatives à PrP<sup>C</sup> sont indiquées sous le western blot. **(D)** Le taux de survie cellulaire suite à un stress thermique est évaluée par un test XTT (activité mitochondriale) sur des cellules N2a transfectées et les valeurs sont normalisées aux cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup>. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ( $n = 5$ ; student's t-test  $*P < 0,005$  sauf CyPrP  $*P = 0,014$  et One Way RM ANOVA Holm-Sidak method  $*P = 0,018$  comparées aux cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup>).

### **Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibent l'assemblage des P-Bodies**

Les GSs sont connues pour être étroitement associées avec d'autres granules d'ARN, nommé P-Bodies (Kedersha et al, 2005). En outre, une étude récente révèle que PrP<sup>C</sup> interagit avec Ago2 au niveau des MVBs et augmente l'association de P-Bodies avec les MVBs probablement par son interaction avec Ago2 (Gibbing et al, 2012). Comme nous avons montré précédemment (article 1), les mutants de PrP<sup>C</sup> inhibent l'activité des miARN, la localisation de GW182 aux MVBs et la formation de GSs, nous avons vérifié l'effet des mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP sur l'assemblage des P-Bodies. Les P-Bodies ont été visualisés par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre DDX6, une ARN hélicase qui réside spécifiquement dans les P-Bodies en condition non stressée. La figure 3A montre que les cellules exprimant les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP ont beaucoup moins de P-bodies visibles au microscope confocal par rapport aux cellules non transfectées et transfectées avec PrP<sup>C</sup>. Nous avons également constaté une augmentation significative de cellules avec peu (<6) ou sans P-Bodies dans les cellules exprimant les mutants de PrP<sup>C</sup> par rapport aux cellules non transfectées et transfectées avec PrP<sup>C</sup> (Figure 3B). Nous avons déterminé par Western blot que le niveau d'expression de deux protéines localisées dans les P-Bodies soit DDX6 et Dcp1a, ne sont pas affecté. Nous avons démontré que l'inhibition de la formation P- Bodies n'était pas due à une diminution de l'expression de DDX6 et de Dcp1a (Figure 3C). Nous avons observé les mêmes résultats dans les cellules HEK293. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la formation des P-Bodies par les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP est indépendante du niveau d'expression des protéines composant les P-Bodies.

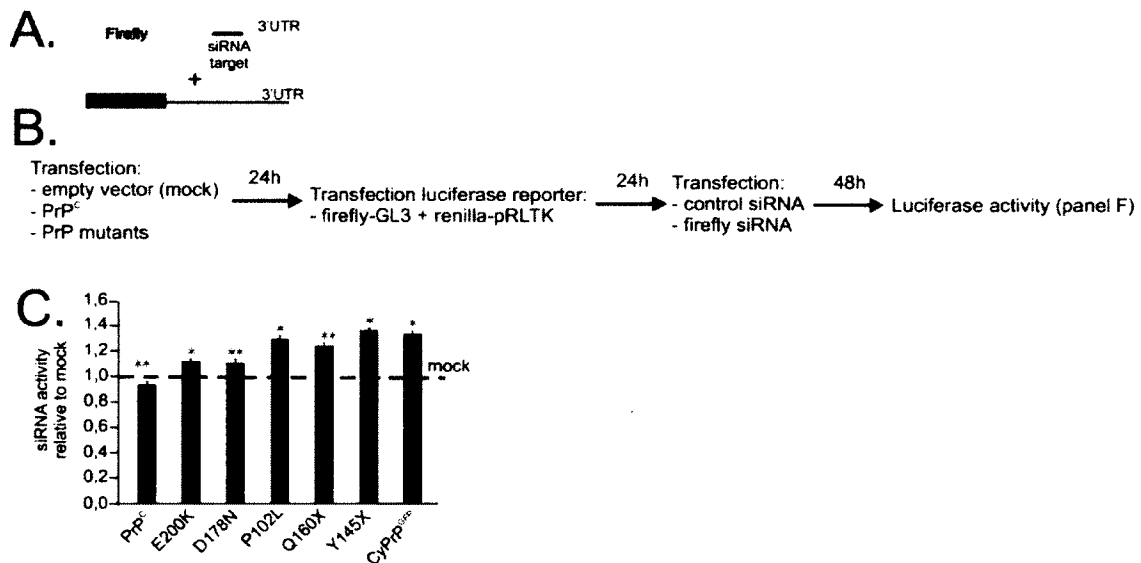


**Figure 3: Les mutants de PrP<sup>C</sup> interfèrent avec la formation des P-Bodies.**  
**(A)** La formation des P-Bodies a été visualisée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps ciblant spécifique DDX6 (canal blanc), un marqueur des P-Bodies, et d'un autre anticorps contre PrP, suivi de la microscopie confocale sur les cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup> ou les mutants de PrP<sup>C</sup> (canal vert). Barres de grossissement: 10 μm. **(B)** La formation des P-Bodies est quantifiée comme le pourcentage de cellules positives pour le P-Bodies (plus de 5 P-Bodies). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n = 4; student's t-test \*P < 0,001 et One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method \*P < 0,001 comparées aux cellules non transfectées et transfectées avec PrP<sup>C</sup>). **(C)** Le niveau d'expression de deux marqueurs des P-Bodies a été vérifié par Western blot à l'aide d'anticorps contre DDX6, dcp1a, β-actin et PrP<sup>C</sup>. Les valeurs relatives de la densitométrie sont indiquées sous les westerns blots. Les valeurs sont normalisées à l'actin et sont relatives à PrP<sup>C</sup>.

### Les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP augmentent l'activité des siARN.

Les P-Bodies sont des composantes de la voie des miARN et siARN, mais leur rôle exact reste controversé. Alors que les mutants de PrP<sup>C</sup> inhibent l'assemblage des P-Bodies et l'activité des miARN (article 1), nous avons déterminé si les mutants PrP familiaux et CyPrP affectent l'activité des siRNA. Nous avons évalué l'activité siRNA avec des essais de

luciférase. Elle consiste à exprimer le gène firefly luciférase (la cible) et rénilla luciférase (contrôle interne) pendant 24h. Les siARN ciblant soit l'ARNm de firefly luciférase ou un siARN négatif (control) sont ensuite transfectés et 24h plus tard le rapport d'activités luciférases (firefly/rénilla) est analysé avec le détecteur de luminescence (Figure 4A). La figure 4C montre que les mutants de PrP<sup>C</sup> augmentent de manière significative l'activité siRNA par rapport aux cellules transfectées avec PrP<sup>C</sup> ou le vecteur vide (Mock). Nous suggérons que l'induction de l'activité de siRNA par les mutants de PrP<sup>C</sup> est probablement une conséquence de l'inhibition des P-Bodies et de l'activation de la voie PACT/PKR.



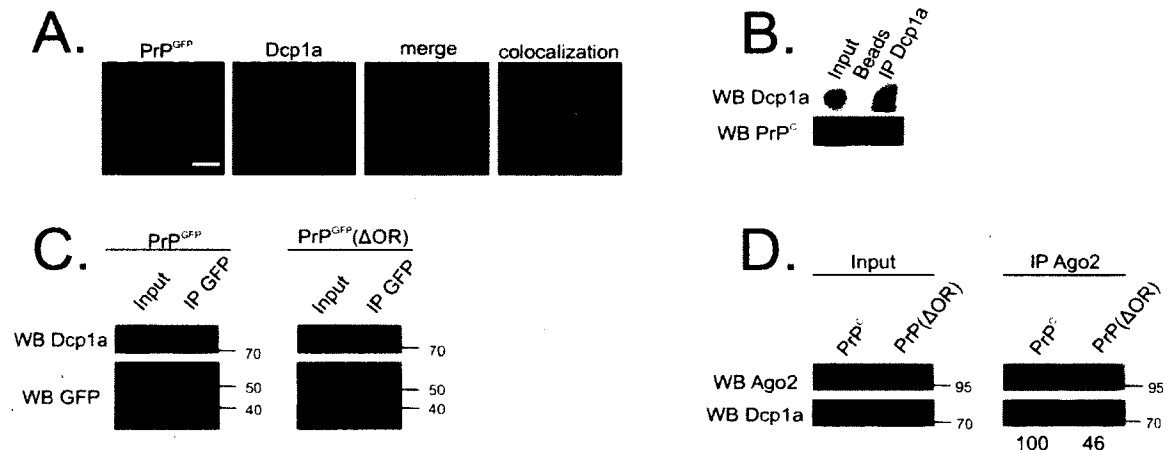
**Figure 4: Les mutants de PrP<sup>C</sup> augmentent l'activité siRNA**

**(A)** Schéma de la firefly luciférase (Fluc) et de la rénilla luciférase (Rluc). L'activité Fluc est d'abord normalisée à l'activité Rluc. **(B)** Schéma du design expérimental. **(C)** L'activité siRNA est déterminée par le ratio de l'activité Fluc normalisée obtenu pour les cellules transfectées avec le siARN Fluc sur celui obtenu pour les cellules transfectées avec le siARN contrôle négatif. L'activité siRNA a été déterminée dans les cellules HeLa transfectées avec le vecteur vide, ou les constructions de PrP. Les valeurs obtenues d'activités siRNA ont été relativisées à la condition de vecteur vide (pointillé à 1). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. (n = 5, le test T \* P < 0,001, \*\* P = 0,02 et une analyse de variance méthode Holm-Sidak P < 0,001).

### PrP<sup>C</sup> interagit avec les P-Bodies et augmente l'association d'Ago2 avec les P-Bodies.

Nous avons précédemment montré que les mutants familiaux affectent la formation des P-Bodies et que PrP<sup>C</sup> interagit avec Ago2, nous avons testés si PrP<sup>C</sup> interagit avec les P-

Bodies. Nous avons d'abord montré par immunofluorescence que PrP<sup>GFP</sup> colocalise avec la protéine dcp1a (enzyme de décoiffage des ARNm) sous forme de granules qui sont les P-Bodies (Figure 5A). Nous avons confirmé l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec dcp1a par co-immunoprécipitation de PrP<sup>C</sup> endogène avec dcp1a (*decapping enzyme 1a*) (Figure 5B). Il est connu que le domaine OR de PrP<sup>C</sup> est essentiel pour son interaction avec Ago2, nous avons donc testé si le domaine OR de PrP<sup>C</sup> est important pour son association avec les P-Bodies. La figure 4C confirme que PrP<sup>GFP</sup> interagit avec dcp1a et que le domaine OR est essentiel pour cette association. Nous avons ensuite déterminé le rôle de PrP<sup>C</sup> dans les P-Bodies en vérifiant si PrP<sup>C</sup> régule l'association d'Ago2 avec les P-Bodies. Pour ce faire, nous avons transfecté PrP<sup>GFP</sup> ou PrP<sup>GFP</sup>( $\Delta$ OR) et procédé à la co-immunoprécipitation de dcp1a avec Ago2. La figure 4D suggère que PrP<sup>C</sup> augmenterait ou stabiliserait l'association d'Ago2 avec les P-Bodies.



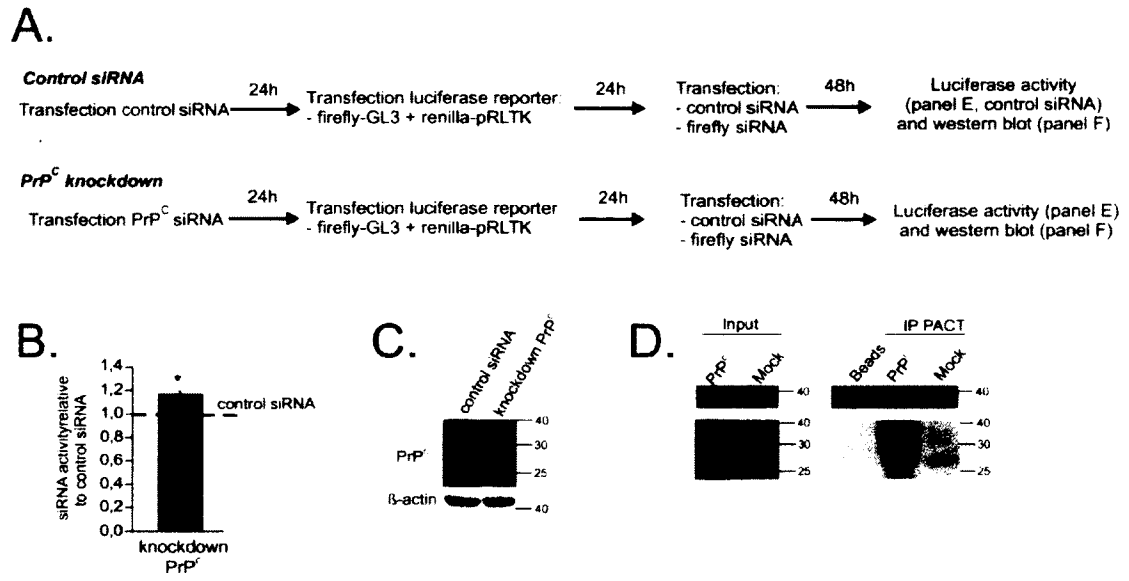
**Figure 5 : PrP<sup>C</sup> interagit avec les P-Bodies et stabilise l'association d'Ago2 avec les P-Bodies.**

(A) L'association entre PrP<sup>C</sup> et les P-Bodies (Dcp1a) a été d'abord visualisée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps contre Dcp1a (canal rouge) et d'un autre contre PrP suivie de la microscopie confocale sur des cellules N2a transfectées avec PrP<sup>GFP</sup> (canal vert). La photo de droite représente les pixels verts et rouges qui colocalisent (canal blanc). (B) L'interaction entre PrP<sup>C</sup> et les P-Bodies a été confirmée en co-immunoprécipitant de PrP<sup>C</sup> endogène avec Dcp1a. (C) L'interaction de PrP<sup>C</sup> avec les P-Bodies et l'implication du domaine OR dans cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation de Dcp1a avec PrP<sup>GFP</sup> ou PrP<sup>GFP</sup>( $\Delta$ OR). (D) Le rôle de PrP<sup>C</sup> dans les P-Bodies a été investigué par co-immunoprécipitation de Dcp1a avec Ago2 dans des cellules N2a exprimant PrP<sup>GFP</sup> ou PrP<sup>GFP</sup>( $\Delta$ OR). Le taux d'association d'Ago2 avec les P-Bodies (Dcp1a) dans les cellules

*exprimant PrP<sup>GFP</sup> ou PrP<sup>GFP</sup>( $\Delta$ OR) est indiqué sous le western blot (écart-type de 13 et student's t-test \*P < 0,001)*

### **PrP<sup>C</sup> diminue l'activité siARN.**

La stabilisation d'Ago2 par PrP<sup>C</sup> au niveau des P-Bodies suggèrent que PrP<sup>C</sup> régulerait l'activité siARN. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des essais de luciférase (Figure 6A) comme décrits précédemment. Nous avons d'abord faits nos essais de luciférase en condition de KD de PrP<sup>C</sup> via la transfection de soit un siARN négatif (control siRNA) ou un siARN ciblant l'extrémité 3' non traduit de l'ARNm de PrP<sup>C</sup> (knockdown PrP<sup>C</sup>) pendant 24h avant de co-transfecter le reporteur firefly luciférase et le contrôle rénilla luciférase. La figure 6B révèle que le KD de PrP<sup>C</sup> (Figure 6C) augmente l'activité des siARN ce qui suggère que contrairement au miARN, PrP<sup>C</sup> régule négativement l'activité siARN. Nous proposons que la stabilisation d'Ago2 par PrP<sup>C</sup> au niveau des P-Bodies puisse expliquer le potentiel de régulateur négatif de PrP<sup>C</sup> sur l'activité siARN puisqu'elle pourrait diminuer l'efficacité du chargement du siRISC en séquestrant Ago2 dans les P-Bodies, la seule des Ago ayant l'activité d'endonucléase. De plus, la figure 6D nous révèle que PrP<sup>C</sup> interagit avec PACT et favorise la formation du miRISC au détriment du siRISC ce qui suggère que cette interaction entre PrP<sup>C</sup> et PACT contribuerait à la régulation négative de l'activité siARN par PrP<sup>C</sup>.



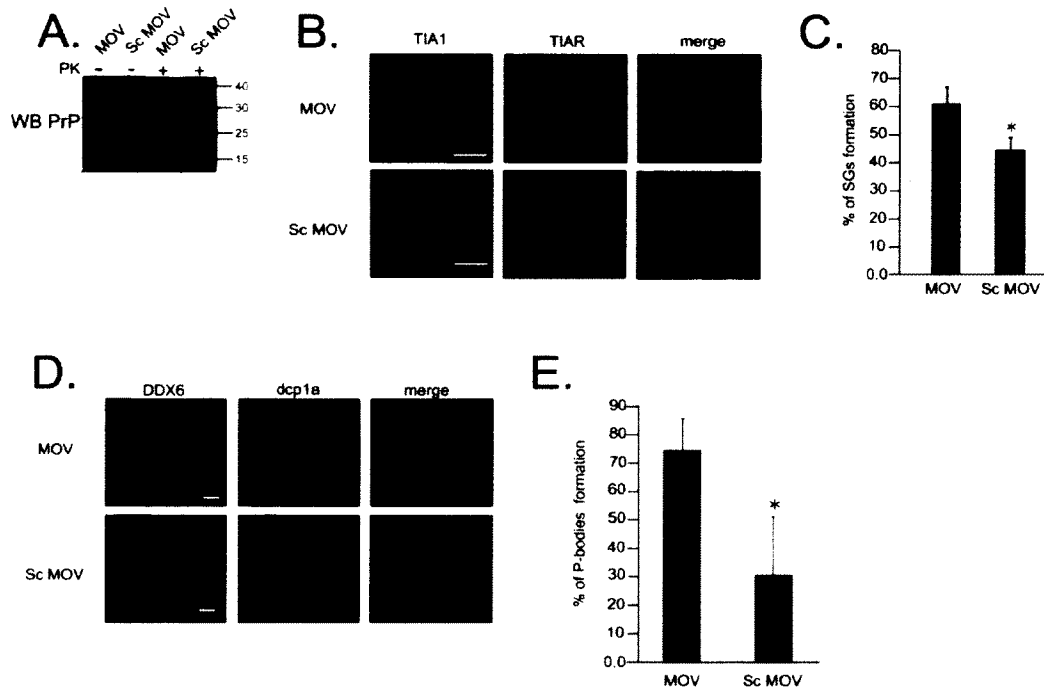
**Figure 6: PrP<sup>C</sup> est un régulateur négatif de l'activité siARN.**

**(A)** Schéma du dispositif expérimental. **(B)** L'activité Fluc est normalisée à l'activité Rluc. L'activité siARN est déterminée par le ratio de l'activité Fluc normalisée obtenu pour les cellules transfectées avec le siARN Fluc sur celui obtenu pour les cellules transfectées avec le siRNA contrôle négatif. L'activité siARN a été déterminée dans les cellules HEK293 transfectées avec le vecteur vide, ou les constructions de PrP. Les valeurs obtenues d'activités siRNA ont été relativisées à la condition du vecteur vide (pointillé à 1). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. ( $n = 4$ , student's t-test  $*P < 0,001$ ). **(C)** Western blot représentatif du knockdown de PrP<sup>C</sup>. **(D)** L'interaction entre PrP<sup>C</sup> et PACT endogène dans les cellules HEK293 et N2a (non montré) a été déterminé par co-immunoprécipitation de PrP<sup>C</sup> avec PACT suivie d'un western blot.

### PrP<sup>Sc</sup> altère la formation des GSs et des P-Bodies comme les mutants de PrP<sup>C</sup>.

Afin de déterminer si l'inhibition des GSs et des P-Bodies sont des mécanismes généraux de neurotoxicité de toutes les ESTs, nous avons testé si les cellules infectées expérimentalement par l'agent infectieux PrP<sup>Sc</sup> inhibent la formation des P-Bodies en condition physiologique et l'assemblage des GSs suite à un stress oxydatif et thermique (non présenté). La formation des GSs a été visualisée par immunofluorescence à l'aide de deux anticorps dirigé soit contre TIA-1 et TIAR. Figure 7B-C montrent que l'infection expérimentale par PrP<sup>Sc</sup> (Figure 7A) inhibe la formation des GSs. La formation des P-Bodies a été évaluée avec des anticorps dirigés contre DDX6 et Dcp1a. Figure 7D-E montrent que la formation des P-Bodies est inhibée par PrP<sup>Sc</sup> comme observé avec les mutants familiaux

de PrP<sup>C</sup>. Ces résultats démontrent que PrP<sup>Sc</sup> et les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> inhibe la formation des deux types de granules d'ARN, les GSs et les P-Bodies, qui sont essentiels pour l'homéostasie et la survie cellulaire.



**Figure 7: PrP<sup>Sc</sup> inhibe la formation des GSs et des P-Bodies.**

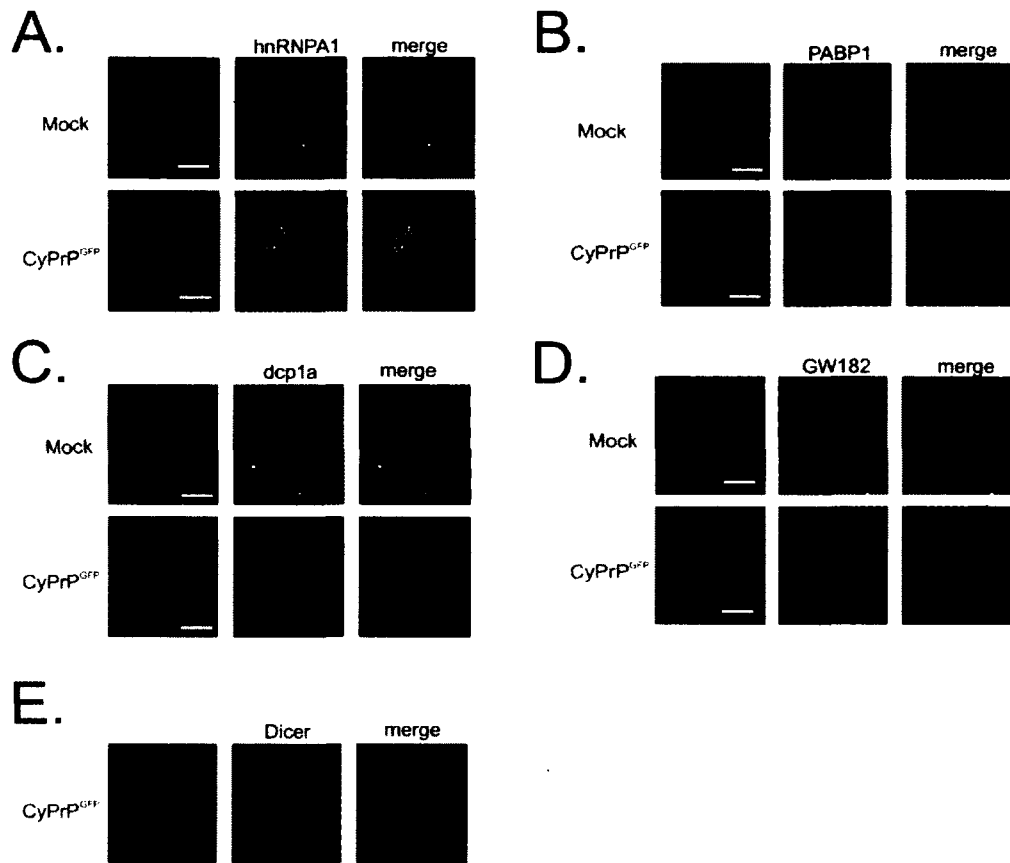
(A) Western blot révélant la résistance à digestion à la protéinase K (PK) de PrP afin de confirmer que les cellules MOV sont infectés ou non par du PrP<sup>Sc</sup>. (B) La formation des GSs suite à un stress cellulaire (oxydatif) est visualisée par immunofluorescence à l'aide de deux anticorps dirigés contre TIA-1 (canal vert) et TIAR (canal rouge) suivie de la microscopie confocale. Barres de grossissement: 10 μm. (C) La formation des GSs est exprimée comme le % de cellules positives pour les GSs (plus de 5GSs). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=4, student's t-test \*P = 0,003) (D) La formation des P-Bodies est contrôlée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps ciblant DDX6 (canal vert) et dcp1a (canal rouge) suivie de la microscopie confocale. Barres de grossissement: 10 μm. (E) La formation des P-Bodies est exprimée en % de cellules contenant des P-Bodies (plus de 5 P-Bodies). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n=3, student's t-test \*P = 0,031)

#### CyPrP séquestre des protéines normalement localisées aux P-bodies et aux GSs.

L'accumulation de PrP<sup>C</sup> dans le cytoplasme (CyPrP) est un mécanisme possible de neurotoxicité. Il est bien connu que l'expression de CyPrP forme spontanément des

agrégats cytoplasmiques qui finalement se concentrent au centrosome et forment une entité nommée agrésome (Beaudoin et al. 2008). Nous avons déterminé par immunofluorescence si les agrésomes de CyPrP peuvent séquestrés certaines protéines importantes des GSs et/ou des P-Bodies. Nous avons observé que l'agrésome de CyPrP séquestre partiellement ou complètement les protéines hnRNPA1 et PABP1, deux marqueurs des GSs ainsi que GW182 et Dcp1a, deux marqueurs des P-Bodies (Figure 8A-D) mais pas la protéine Dicer (Figure 8E). Ces résultats démontrent que l'agrésome de CyPrP séquestre certaines protéines spécifiquement associées aux différents types de granules d'ARN et que cette séquestration pourrait expliquer l'inhibition des GSs et des P-Bodies observée précédemment.





**Figure 8: CyPrP séquestre des protéines importantes pour les GSs et les P-Bodies.** Immunofluorescences à l'aide d'anticorps dirigés contre *hnRNPA1* (A), *PABP1* (B), *dcp1a* (C), *GW182* (D) et *Dicer* (E) (canal blanc) suivie de la microscopie confocale sur des cellules *N2a* non stressées exprimant ou non *CyPrP<sup>GFP</sup>* (canal vert). Barres de grossissement: 10  $\mu$ m.

## DISCUSSION

Plusieurs fonctions sont attribuées à PrP<sup>C</sup> dans différents processus cellulaires. Plusieurs groupes se demandent comment une seule protéine peut être impliqués dans une telle quantité de processus cellulaire. Récemment, il a été démontré que PrP<sup>C</sup> augmente l'efficacité des miARN ce qui pourrait expliquer ces fonctions diverses. Nous avons caractérisé cette nouvelle fonction PrP<sup>C</sup> dans le système d'ARNi et investiguer son implication dans les ESTs. Le domaine OR de PrP<sup>C</sup> est responsable de l'augmentation de l'efficacité des miARN. Cette activité de PrP<sup>C</sup> dans le système ARNi est affecté par son mauvais repliement induit par les mutations familiales. Le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup> inhibe la maturation des MVBs par la délocalisation d'Alix ce qui induit une délocalisation de GW182, une diminution de l'efficacité des miARN et une diminution de la production des exosomes. Ensuite, nous avons investigué l'effets des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> sur la formation de deux types de granules d'ARN, les GSs et les P-bodies, qui sont associées aux systèmes ARNi. Ces deux types de granules d'ARN sont essentielles pour la survie cellulaire en réponse à un stress environnementaux cellulaires. Nous avons donc également caractérisé le rôle de la réponse au stress cellulaire et de la formation de ces deux type de granules dans les ESTs. Le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup> induit la réponse au stress PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  dépendante mais inhibe la formation des GSs et des P-Bodies. Cette inhibition des GSs et des P-Bodies augmente la susceptibilité des cellules aux différents stress cellulaires. Enfin, nous avons investigué un lien possible entre la dérégulation de la réponse au stress et du système d'ARNi par les mutants familiaux.

### **Le rôle de PrP<sup>C</sup> dans le système d'ARNi:**

Les récents résultats obtenues par le groupe de Voinnet (Gibbing et al, 2012) sur la capacité de PrP<sup>C</sup> d'augmenter l'efficacité des miARN ont été confirmé par notre étude (article 1). En résumé, PrP<sup>C</sup> interagit avec deux complexes importants du système d'ARNi soit le RLC (Dicer, PACT et Ago2) et le RISC (Ago2 et GW182). (Gibbings et al, 2012 et

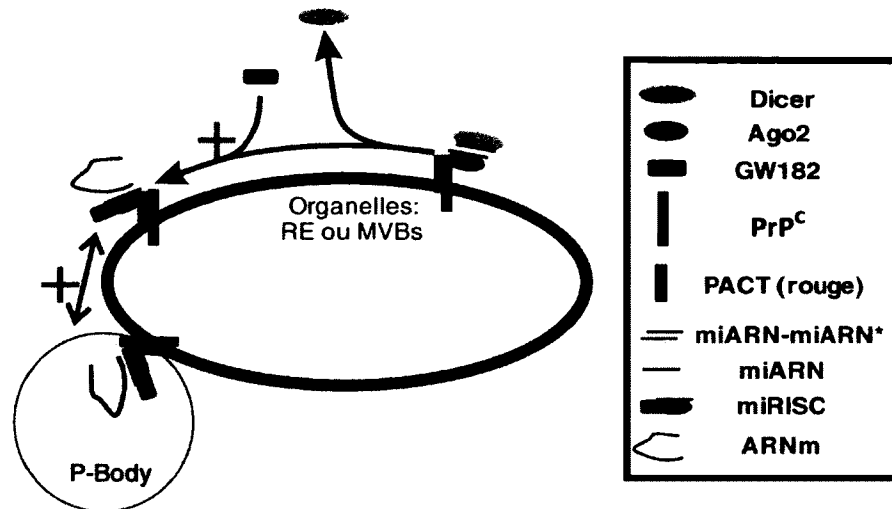
article 1). L'interaction de PrP<sup>C</sup> avec ces deux complexes se localise aux MVBs et favoriserait la dissociation des Ago-miARN du complexe RLC afin de former le RISC. PrP<sup>C</sup> n'affecte pas l'activité du RLC puisque son expression n'influence pas la maturation des miARN. Les expériences de knockdown ont démontré que PrP<sup>C</sup> est essentielle pour une activité optimale des miARN (Gibbins et al, 2012 et article 1).

En plus, nous proposons que l'interaction de PrP<sup>C</sup> avec PACT en condition physiologique accentue le potentiel régulateur de PrP<sup>C</sup> sur l'efficacité des miARN, puisqu'il est connu que PACT interagit avec les Ago dans le RLC et le RISC afin de favoriser les miARN au détriment des siARN (Lages et al, 2012, Lee et al, 2013). Cette interaction entre PrP<sup>C</sup> et PACT pourrait donc expliquer les effets divergents de PrP<sup>C</sup> sur l'efficacité des miARN et siARN, puisque nous avons démontré que, contrairement aux miARN, le knockdown de PrP<sup>C</sup> augmente l'activité des siARN. Nous suggérons que l'association de PrP<sup>C</sup> avec PACT favoriserait la formation du miRISC et de son activité au détriment du siRISC.

PrP<sup>C</sup> interagit également avec les P-Bodies et stabilise l'association d'Ago2 avec les P-Bodies ce qui contribuerait à son rôle d'activateur des miARN et de répresseur de l'activité siARN. Le groupe de Voinnet a aussi observé que l'expression de PrP<sup>C</sup> est importante pour l'association d'Ago2 avec les MVBs et les P-Bodies, et que le knockdown de PrP<sup>C</sup> diminue ces associations (Gibbins et al, 2012). Nous proposons que la stabilisation d'Ago2 au niveau des P-Bodies par PrP<sup>C</sup> pourrait diminuer l'efficacité du chargement du siRISC en séquestrant Ago2 ce qui contribuerait à son potentiel de régulateur négatif de l'activité siARN. De plus, la délocalisation d'Ago2 des MVBs lors du knockdown de PrP<sup>C</sup> pourrait expliquer l'augmentation de l'activité siARN puisqu'il est connu que l'activité d'endonucléase d'Ago2 se produit au niveau du cytosol (Detzer et al, 2009, Gilleron et al, 2013, Perez et al, 2011) et d'autres compartiments intracellulaires tel le RE (Stalder et al, 2013). Une récente étude a démontré que le RLC et le RISC sont associés à la surface cytoplasmique de la membrane du RE via les protéines PACT et TRBP et que l'activité d'endonucléase d'Ago2 est associée majoritairement au RE (Stalder et al, 2013). Nous proposons que les interactions de PrP<sup>C</sup> avec Ago2, GW182 et PACT puissent avoir lieu

aussi au RE et ainsi favoriser les miARN au détriment des siARN. Il est connu que la translocation de PrP<sup>C</sup> au RE est peu efficace (Rane et al, 2008, Rane et al, 2010) et qu'elle dépend de certaines régions en C-terminale de PrP<sup>C</sup> suggérant que sa translocation se fait tardivement lors de sa synthèse (Gu et al, 2008, Holscher et al, 2001, Kim et al, 2001, Pfeiffer et al, 2013). Il serait intéressant de vérifier le rôle de PrP<sup>C</sup> au niveau du RE et des P-bodies dans la régulation de l'activité des ARNi et des différents complexes associées au système d'ARNi (RLC et RISC).

En résumé, nous proposons un modèle (Figure 21) où par son association avec PACT, Ago2, les P-Bodies et les MVBs, PrP<sup>C</sup> favoriserait l'activité des miRISC au détriment des siRISC. Ce nouveau rôle de PrP<sup>C</sup> dans la régulation du système ARNi pourrait expliquer les différentes fonctions qui lui sont attribuées. Par exemple, il est connu que PrP<sup>C</sup> est impliquée dans divers processus cellulaires régulés par les miARN, en particulier le miARN let-7a, tels que la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires (Miranda et al, 2011a, Miranda et al, 2011b), des cellules pluripotentes hématopoïétiques (Zhang et al, 2006) ou neurales (Bremer et al, 2010), dans l'accumulation des intégrines au niveau des cellules souches embryonnaires (Miranda et al, 2011a, Miranda et al, 2011b, Muller & Bosserhoff, 2008), et dans son rôle anti-apoptotique (Gibbins et al, 2012). En plus, plusieurs de ces processus dépendent du même domaine de PrP<sup>C</sup> impliqué dans l'efficacité des miARN, c'est-à-dire le domaine OR supportant notre hypothèse que ce rôle de PrP<sup>C</sup> dans la régulation des miARN contribue aux différentes fonctions qui lui sont attribuées.



**Figure 21 : Modèle de la fonction de PrP<sup>C</sup> dans l'activité des miARN**

*La formation du RLC (Dicer/TRBP/PACT/Ago2/miARN-miARN\*) se produit au niveau de diverses organites comme le RE et les MVBs. Nous proposons que PrP<sup>C</sup> par son interaction avec Ago2 et PACT favorise(+) la formation du miRISC à la surface cytoplasmique de ces organites et ainsi augmente l'efficacité des miARN. PrP<sup>C</sup> stabiliserait (+) l'association entre Ago2, les P-Bodies et les MVBs ce qui accentuerait possiblement les échanges entre les deux entités.*

### Régulation des miARN par PrP<sup>C</sup> et le cancer

PrP<sup>C</sup> est également impliquée dans divers types de cancer en particulier dans les processus tumorigéniques, de multi-résistances et métastatiques (Cheng et al, 2013, Dery et al, 2013, Du et al, 2013, Li et al, 2010, Li et al, 2011, Mehrpour & Codogno, 2010, Wang et al, 2011, Wang et al, 2012a, Yap & Say, 2012, Yu et al, 2012, Zhuang et al, 2012). Par exemple, la diminution de l'expression de PrP<sup>C</sup> accentue la résistance des cellules cancéreuses mammaires au traitement à la doxorubicine en augmentant l'expression des protéines de la famille des Bcl-2 (Yu et al, 2012). Curieusement, l'étude de Gibbins (Gibbins et al, 2012) a montré que le knockdown et le KO de PrP<sup>C</sup> diminue l'activité du miARN let-7a et miR-16 ce qui augmente la traduction de leurs cibles dont les protéines Bcl-2 et RAS. Ces protéines sont respectivement une protéine anti-apoptotique et un proto-oncogène ce qui suggère que PrP<sup>C</sup> en régulant l'efficacité des miARN affecte les processus tumorigéniques, de multi-résistances et métastatiques. De plus, comme pour

les miARN, le domaine OR de PrP<sup>C</sup> est essentiel pour l'acquisition du phénotype de multi-résistance (Wang et al, 2012). Il est connu que les différentes drogues utilisées en clinique induisent des stress cellulaires tels qu'un stress au RE ou au protéasome. Ces deux types de stress cellulaires favorisent l'expression et/ou l'accumulation cytoplasmique de PrP<sup>C</sup> (Dery et al, 2013, Miesbauer et al, 2010, Nunziante et al, 2011, Orsi et al, 2006, Rane et al, 2008, Shi & Dong, 2011, Soto, 2008) et donc le mauvais repliement de PrP<sup>C</sup>. Nous proposons que cette accumulation cytoplasmique de PrP<sup>C</sup> puisse inhiber l'activité du miARN let-7a et ainsi favoriser la survie cellulaire. Il serait donc intéressant d'investiguer l'implication de ce nouveau rôle de PrP<sup>C</sup>, régulateur des miARN, dans les processus liés au cancer.

### **Les mutants familiaux et CyPrP induisent la réponse au stress PACT/PKR/eIF2 $\alpha$ et affectent le système d'ARNi en altérant la maturation des MVBs et la formation des P-Bodies**

Nous avons montré que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> diminuent l'efficacité des miARN et altèrent la maturation des MVBs et conséquemment, la formation des exosomes. La délocalisation d'Alix (marqueur des MVBs) supporte l'hypothèse que les mutants de PrP<sup>C</sup> altèrent la maturation des MVBs en inhibant l'activité de certaines protéines des ESCRTs dont Alix et mahogunin, et des protéines Rabs qui sont connues pour être essentielles pour la maturation adéquate des MVBs. Nous proposons également que cette dérégulation des MVBs par les mutants familiaux soit responsable de la diminution de l'efficacité des miARN et de la formation des exosomes. Notre hypothèse est supportée par la délocalisation de GW182 des MVBs et par une étude récente (Gibbins & Voinnet, 2010, Gibbins et al, 2009) démontrant qu'une altération de la maturation des endosomes vers les MVBs induite par Alix inhibe l'efficacité des miARN. Il est aussi bien établi que le système endolysosomal est affecté dans les ESTs et par certains mutants artificiels de PrP<sup>C</sup> (Arnold et al, 1995, Ashok & Hegde, 2009, Biasini et al, 2010, Ermolayev et al, 2009, Ersdal et al, 2009, Filimonenko et al, 2007, Gawinecka et al, 2012,

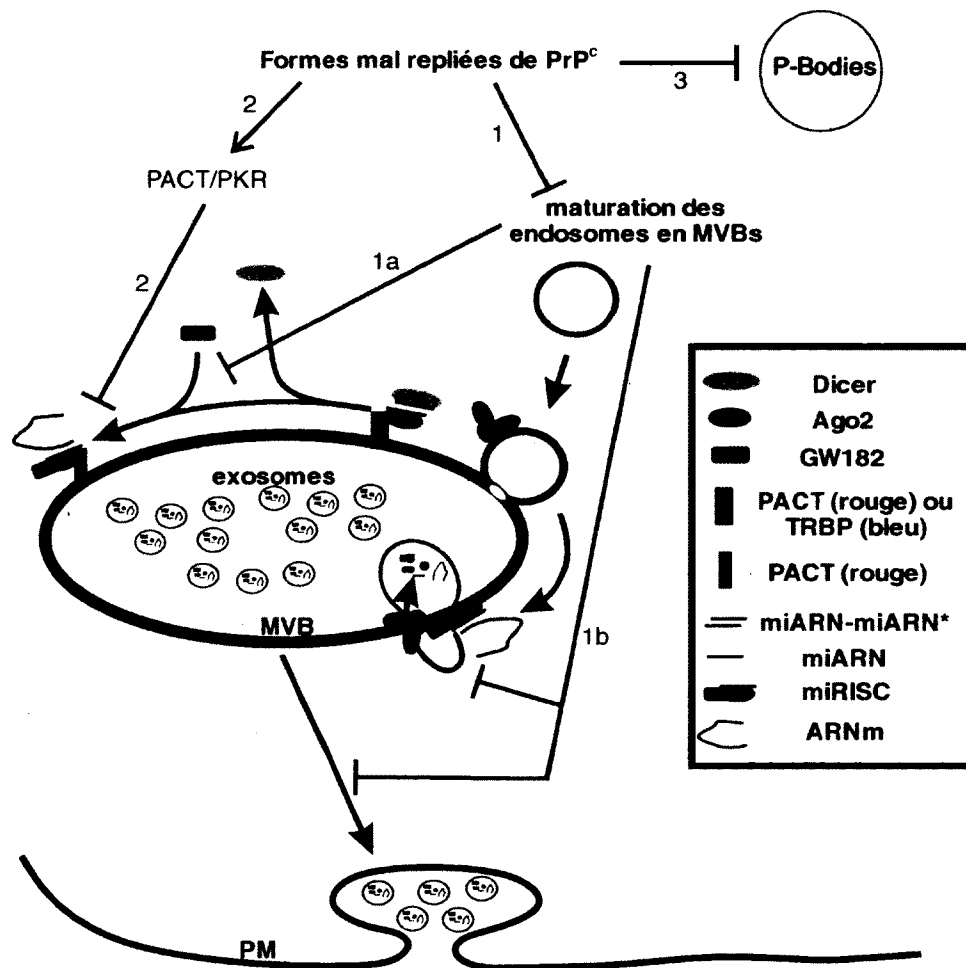
Kovacs et al, 2007, Massignan et al, 2010, Zafar et al, 2011). Par exemple, PrP<sup>Ctm</sup> et CyPrP inhibent la maturation des MVBs par leur interaction avec la Mahogunin (Aguzzi & Steele, 2009, Chakrabarti & Hegde, 2009). Des récentes études ont aussi démontré que les cellules infectées expérimentalement par PrP<sup>Sc</sup> ont une signature de miARN intracellulaire bien distincte et que leurs exosomes ont des altérations morphologiques et une composition particulière en miARN (Bellingham et al, Gibbings et al, Lukiw et al, 2011, Provost, 2010, Saba et al, 2008). Ces différents résultats appuient notre hypothèse que les mutants familiaux et CyPrP dérèglent la maturation des MVBs et conséquemment, inhibent l'efficacité des miARN et altèrent la formation des exosomes.

Également, de façon similaire au knockdown de PrP<sup>C</sup>, les mutants familiaux et CyPrP ont l'effet inverse sur les siARN, c'est-à-dire qu'ils augmentent l'activité siARN. Nous suggérons que l'inhibition des P-Bodies et la délocalisation du RISC des MVBs par les mutants contribuent à cette dérégulation du système ARNi puisque comme mentionné auparavant, l'activité d'endonucléase d'Ago2 est associée à d'autres compartiments intracellulaires comme le cytosol (Detzer et al, 2009, Gilleron et al, 2013, Perez et al, 2011) et le RE (Stalder et al, 2013). De plus, nous avons aussi démontré que les mutants de PrP<sup>C</sup> induisent la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante via l'activation de PACT/PKR. Différentes études (Lee et al, 2013, Paroo et al, 2009, Singh et al, 2011) suggèrent que l'activation de PACT par les stress cellulaires affecterait son activité sur le système ARNi puisque son activation se traduit par sa phosphorylation, sa dimérisation et sa liaison à PKR. Ces études suggèrent que l'activation de PACT influencerait son interaction avec le système ARNi et donc son potentiel régulateur de l'activité des ARNi. L'activation de PKR par PACT induit aussi le relâchement de TRBP. TRBP est connue pour lier PKR afin de la maintenir sous sa forme inactive (Daher et al, 2009, Ito et al, 1999, Li et al, 2006, Patel & Sen, 1998a, Peters et al, 2009, Singh et al, 2009, Singh et al, 2011, Singh & Patel, 2012) mais également pour interagir avec le RISC afin de favoriser l'activité siARN (Kok et al, 2007, Koscianska et al, 2011, Lee et al, 2013, Lee et al, 2006b, Noland & Doudna, 2013, Stalder et al, 2013). Nous proposons que cette activation de PACT par les mutants de PrP<sup>C</sup> contribue à la dérégulation de l'activité des ARNi via probablement la perte d'interaction de PACT avec

le RISC, par le relâchement de TRBP et son gain d'interaction avec le RISC. Il serait important de vérifier le lien possible entre PrP<sup>C</sup>, le système d'ARNi et la réponse au stress PACT/PKR dépendante.

Nous proposons un modèle (Figure 22) où les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> activent la voie PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  et altèrent la maturation des endosomes en MVBs et la formation des P-Bodies. Ces altérations seraient responsables de la dérégulation de l'activité des ARNi, c'est-à-dire de la diminution de l'efficacité des miARN et de l'augmentation de l'activité siARN.





**Figure 22 : Modèle de l'altération du système ARNi par les formes mal repliées de PrP<sup>c</sup>**

Les formes mal repliées de PrP<sup>c</sup> induites par les mutants de PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>Sc</sup> affectent l'activité des ARNi par trois mécanismes soit : 1) en inhibant la maturation des MVBs via la délocalisation d'Alix. Ceci altère la production d'exosomes (1b) et empêche le recrutement du RISC (GW182) à la membrane du MVBs (1a) inhibant ainsi l'efficacité des miARN; 2) en induisant l'activation de la voie PACT/PKR ce qui altérerait la capacité de PACT d'interagir avec les protéines du système d'ARNi et ainsi favoriserait la formation du siRISC (TRBP-Ago2) et de son activité au détriment du miRISC (PACT-Ago-GW182); ou encore 3) en altérant la formation des P-Bodies. L'inhibition des MVBs et des P-bodies contribuerait à l'augmentation de l'activité des siARN en libérant plus d'Ago2 dans le cytosol ce qui favoriserait la formation du siRISC et de son activité.

**Les mutants de PrP<sup>C</sup> induisent l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante mais inhibent la formation des GSs.**

Plusieurs études ont démontré *in vivo* et *in cellulo*, que l'infection par PrP<sup>Sc</sup> ou l'expression de CyPrP induit la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante via l'activation des kinases de stress PKR et PERK (Goggin et al, 2008, Moreno et al, 2012, Paquet et al, 2009, Roffe et al, 2010). Récemment, Moreno et al (Moreno et al, 2012) ont démontré que l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante est responsable de la neurodégénérescence puisque l'inhibition de cette voie rétablit *in vivo* l'excitabilité neuronale et la survie neuronale dans un modèle de souris expérimentalement infectée par PrP<sup>Sc</sup>. Cependant, l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante favorise normalement la survie cellulaire, sauf si elle est constitutivement induite ou encore si les voies en aval comme la formation des GSs, sont affectées (Arimoto et al, 2008, Baguet et al, 2007, Eisinger-Mathason et al, 2008, Fournier et al, 2013, Fujimura et al, 2012, Gareau et al, 2011, Takahashi et al, 2013, Zou et al, 2011, Zou et al, 2012). Nous avons démontré précédemment que l'expression de CyPrP induit non seulement l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante mais inhibe la formation des GSs ce qui augmente la susceptibilité des cellules aux stress cellulaires (Goggin et al, 2008). Dans cette thèse, nous avons d'abord démontré que les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et CyPrP induisent l'activation de la voie PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  mais sans induire la formation des GSs. De plus, nous avons montré que PrP<sup>Sc</sup> et les mutants de PrP<sup>C</sup> inhibent aussi la formation des GSs en réponse à des stress cellulaires environnementaux comme le stress thermique et oxydatif. Cette altération dans la biogénèse des GSs augmente la susceptibilité des cellules à la mort cellulaire. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle protecteur des GSs. Par exemple, les GSs sont essentielles pour une réponse anti-oxydative et que leur inhibition augmente la production de ROS (Takahashi et al, 2013) comme observée dans les ESTs (Pamplona et al, 2008, Petersen et al, 2005). Cette production accrue de ROS intracellulaire augmente le stress oxydatif, les dommages cellulaires et finalement la mort des cellules (Takahashi et al, 2013). Les cellules neuronales étant des cellules ne se renouvelant pas sont très susceptibles aux stress cellulaires et aux dommages qu'ils peuvent causer. Les GSs favorisent aussi la survie

cellulaire en séquestrant des facteurs pro-apoptotiques (Arimoto et al, 2008, Kim et al, 2005, Thomas et al, 2011, Tsai & Wei, 2010, Yoneda et al, 2001) et en activant des facteurs anti-apoptotiques (Eisinger-Mathason et al, 2008, Li et al, 2004, Thomas et al, 2011). Il serait crucial de vérifier si ces différents facteurs sont affectés dans les ESTs.

Nous proposons que l'inhibition des GSs soit un mécanisme général de neurotoxicité de toutes les ESTs. Notre hypothèse est supporté par : 1) nos résultats démontrant que comme l'expression des mutants de PrP<sup>C</sup>, l'infection par du PrP<sup>Sc</sup> inhibe la formation des GSs, et 2) par l'étude du groupe de Moreno (Moreno et al, 2012) qui confirme que l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante est responsable de la neurodégénérescence induite lors d'infection expérimentale aux PrP<sup>Sc</sup>. 3) De plus, normalement en condition de stress cellulaire, il y a désassemblage des polysomes et accumulation des différentes complexes ribosomiaux (40S, 60S et 80S). Cependant, les auteurs de l'étude de Moreno *et al* ont observés que PrP<sup>Sc</sup> induit le désassemblage des polysomes confirmant l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante, mais aucune accumulation des sous-unités ribosomiales n'a été observée. Ceci appuie nos résultats d'activation de la réponse au stress et d'inhibition des GSs.

### **Mécanisme d'inhibition des GSs et des P-Bodies par les espèces mal repliées de PrP<sup>C</sup>**

Les GSs sont étroitement associées à d'autres types de granules dont les P-Bodies et les polysomes (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2008, Anderson & Kedersha, 2009, Buchan et al, 2008, Buchan & Parker, 2009, Hu et al, 2010, Kedersha & Anderson, 2002, Kedersha et al, 2005, Kedersha & Anderson, 2007, Kedersha & Anderson, 2009, Lavut & Raveh, 2012, Moser & Fritzler, 2013, Nonhoff et al, 2007, Thomas et al, 2011). Les GSs et les P-Bodies possèdent plusieurs protéines en commun (Anderson & Kedersha, 2006, Anderson & Kedersha, 2009, Kedersha & Anderson, 2007, Thomas et al, 2011) et beaucoup d'échanges de matériel s'effectuent entre les deux granules et avec les polysomes. Ce dynamisme permet une régulation adéquate du métabolisme des ARNm et de leur traduction afin d'induire l'expression de protéines essentielles à l'homéostasie

cellulaire et à la survie cellulaire (Fournier et al, 2010, Fournier et al, 2013, Gareau et al, 2011, Silver & Noble, 2012). Nous avons démontré qu'en plus d'inhiber l'assemblage des GSs, les mutants de PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> interfèrent avec la formation des P-Bodies. La formation des P-Bodies comme celle des GSs est nécessaire pour la survie cellulaire (Lavut & Raveh, 2012). Nous suggérons que l'inhibition des P-Bodies pourrait altérer l'assemblage des GSs puisqu'il est connu que la formation des GSs s'initie juxtaposément aux P-Bodies et même que la présence des P-Bodies serait requise afin d'initier la formation des GSs (Buchan et al, 2008, Buchan & Parker, 2009, Yoon et al, 2010). Cependant le rôle des P-Bodies dans la formation des GSs demeure controversé. Les P-Bodies inhibent aussi la rétrotransposition des rétrovirus endogènes et d'autres éléments rétrotransposables (Beckham et al, 2007, Beckham & Parker, 2008, Beliakova-Bethell et al, 2006, Checkley et al, 2010, Larsen et al, 2008, Lu et al, 2011, Lu et al, 2012). Or, certaines études ont montré que chez des patients atteints d'ESTs, il y a une augmentation des rétrovirus endogènes (Akowitz et al, 1993, Akowitz et al, 1994, Ashok & Hegde, 2006, Carp et al, 1999, Gabus et al, 2001, Gibson, 2001, Greenwood et al, 2011, Jeong et al, 2010, Lee et al, 2006, Lotscher et al, 2007a, Lotscher et al, 2007b, Stengel et al, 2006a, Stengel et al, 2006b) et des éléments rétrotransposables comme les séquence Alu (Kiesel et al, 2010, Kiesel et al, 2011, Kiesel et al, 2012, Kiesel et al, 2012) ce qui supporte nos résultats d'inhibition des P-Bodies. De plus, les rétrovirus endogènes et les rétrotransposons sont de long ARNdb pouvant potentiellement activer la kinase de stress PKR. Il est aussi connu que la réactivation des rétrovirus endogène induit une neurodégénérescence qui est semblable aux ESTs (Leblanc et al, 2006, Li et al, 2011b, Munk et al, 1997, Roberts et al, 2010). Nous proposons que l'inhibition des P-Bodies induirait la réactivation des rétrovirus endogènes ce qui pourrait contribuer à l'activation de la voie PKR/eIF2 $\alpha$  et au processus de neurodégénérescence.

Plusieurs voies signalétiques induisant l'assemblage/désassemblage de ces deux types de granules sont altérées lors d'ESTs. Par exemple, une étude récente (Fournier et al, 2013) a démontré que la voie mTORC1/eIF4E est essentielle pour la formation des GSs, car l'inhibition de l'activité de mTORC1 ou du complexe eIF4E abolit la formation des GSs. La protéine mTORC1 phosphoryle le facteur 4E-BP1 ce qui inhibe son interaction avec eIF4E

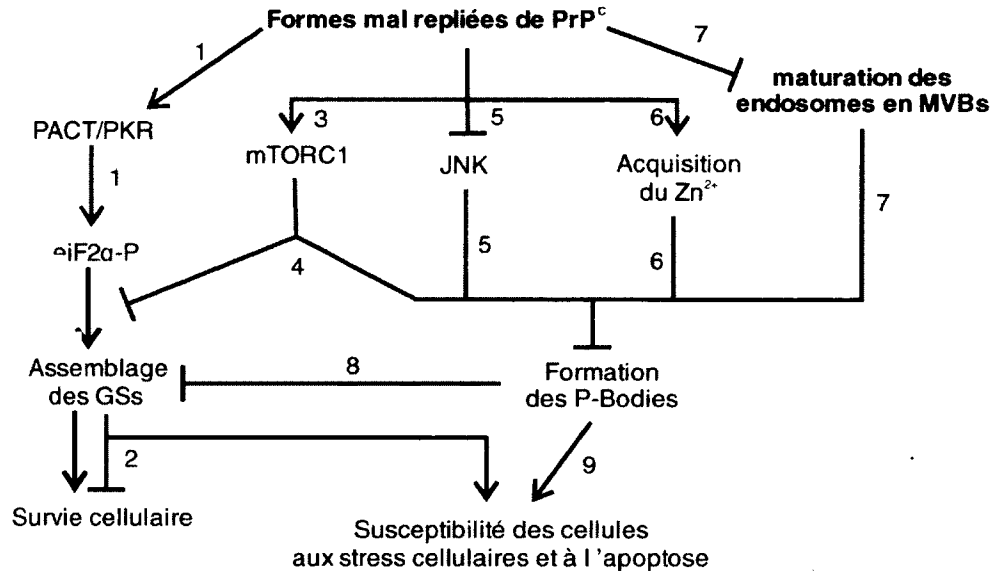
et conséquemment favorise l'interaction entre eIF4G et eIF4E (complexe de reconnaissance de la coiffe). Les auteurs ont démontré que l'inhibition des GSs augmente la susceptibilité des cellules aux stress cellulaires puisqu'elle permet de libérer et de traduire l'ARNm codant pour la protéine p21 qui est normalement séquestrée dans les GSs. L'expression du facteur pro-apoptotique p21 augmente la susceptibilité des cellules aux stress cellulaires et ainsi la mort cellulaire. L'activité de mTORC1 est aussi importante pour l'assemblage des P-Bodies puisque son inhibition altère grandement la capacité des cellules à former des P-Bodies (Gudkova et al, 2011). Une étude récente a démontré que l'inhibition de mTORC1 induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  via l'activation de la kinase de stress PKR. Cette activation de la voie mTORC1/PKR/eIF2 $\alpha$  induit l'expression de protéines impliquées dans l'apoptose comme p21 (Ozpolat et al, 2012). De plus, l'inhibition de la voie mTORC1 induit l'autophagie qui est étroitement associée au désassemblage des granules de stress et des P-Bodies (Buchan et al, 2013). De plus, il est connu que l'infection par PrP<sup>Sc</sup> altère l'activation de la voie mTORC1 induisant une diminution de la synthèse protéique (Roffe et al, 2010). Une autre étude récente a confirmé que l'activité de la voie mTORC1 est diminuée par l'infection aux PrP<sup>Sc</sup> et par les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> et serait responsable de l'activation de la macroautophagie (Xu et al, 2012). Nous proposons que l'altération de la voie mTORC1 par les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> puisse être responsable de l'induction de la voie PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  et de l'inhibition des GSs et des P-Bodies que nous avons observées.

De plus, l'assemblage des P-Bodies est régulé par d'autres voies signalétiques telles que la voie JNK dépendante (Cargnello et al, 2012, Rzeczowski et al, 2011). JNK induit la phosphorylation de Dcp1a qui est une des protéines centrales des P-Bodies (Rzeczowski et al, 2011). La phosphorylation contrôlée de Dcp1a induit l'assemblage des P-Bodies. Cependant, une activité trop élevée de JNK induit le désassemblage des P-Bodies démontrant l'importance d'une régulation adéquate des différentes voies signalétiques régulant la formation des P-Bodies (Rzeczowski et al, 2011). La voie JNK est suractivée dans les ESTs et elle serait impliquée dans la neurotoxicité (Carimalo et al, 2005, Lee et al, 2005, Simon et al, 2013). Les GSs séquestrent et inactivent deux protéines responsables

de l'activation de JNK et de son activité pro-apoptotique soit ROCK1 et RACK1 (Arimoto et al, 2008, Tsai & Wei, 2010). Il serait donc possible que l'inhibition des GSs accentue l'activité de la voie JNK ce qui contribuerait à l'inhibition des P-Bodies.

Enfin, il a été démontré que PrP<sup>C</sup> joue un rôle important dans l'acquisition du Zn<sup>2+</sup> au niveau des cellules neuronales et que PrP<sup>Sc</sup> et les mutants familiaux de PrP<sup>C</sup> perdent cette activité (Watt & Hooper, 2003, Watt et al, 2012). Le Zn<sup>2+</sup> est un oligoélément essentiel à l'activité de plusieurs protéines et à différent processus cellulaire. Par exemple, le Zn<sup>2+</sup> serait nécessaire au processus d'agrégation de Dcp1a qui initie la formation des P-Bodies (Blumenthal & Ginzburg, 2008). Cependant aucune étude n'a investigué le rôle du Zn<sup>2+</sup> dans l'assemblage des GSs. Il serait donc possible que le changement de l'homéostasie du Zn<sup>2+</sup> observées dans les ESTs se traduisant par une diminution du Zn<sup>2+</sup> intracellulaire induit l'inhibition des P-Bodies. En résumé, plusieurs voies signalétiques qui sont connues pour être dérégulées dans les ESTs peuvent expliquer l'inhibition des P-Bodies et des GSs par les mutants de PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup>.

Globalement, nous proposons un modèle (Figure 23) expliquant la toxicité des formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>. Ces formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> inhibent la maturation des MVBs, la formation des P-Bodies et activent la réponse au stress PACT/PKR/eIF2 $\alpha$ . Conséquemment, l'activité des ARNi est affectée, c'est-à-dire que ces altérations induites par les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> inhibent l'efficacité des miARN mais promeut l'activité siARN. Normalement, l'activation de la réponse au stress eIF2 $\alpha$  dépendante favorise la survie cellulaire via la formation des GSs. Cependant, nous avons montré que les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> inhibent la formation des GSs ce qui augmente la susceptibilité des neurones aux différents stress cellulaires (Figure 23). Nous suggérons que plusieurs mécanismes connus pour être dérégulés dans les ESTs et ayant un rôle dans la formation des GS et/ou des P-Bodies seraient responsables de l'inhibition de ces deux types de granules, comme l'inhibition de la voie mTORC1, la suractivation de la voie JNK et la diminution de l'acquisition du Zn<sup>2+</sup> (Figure 23). La compréhension des mécanismes de neurotoxicité induits en réponse aux formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> est cruciale pour le développement de médicaments.



**Figure 23 : Modèle du mécanisme de neurotoxicité impliquant l'inhibition de deux types de granules d'ARNs, P-Bodies et GSs, par les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>**

Les mutants de PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> induisent la formation de formes toxiques et mal repliées de PrP<sup>C</sup>. Ces formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> activent la réponse au stress PACT/PKR/eIF2α dépendante (1) mais inhibent la formation des GSs et des P-Bodies. Cette inhibition des GSs et des P-Bodies augmente la susceptibilité des neurones aux stress cellulaires et ainsi la mort neuronales (2, 9). Nous proposons différents mécanismes qui sont connus pour être altérés dans les ESTs et être impliqués dans la régulation de l'assemblage des GSs et/ou des P-Bodies. Par exemple, l'activité adéquate de la voie signalétique de mTORC1 est cruciale pour la formation des GSs et des P-Bodies. Il est connu que les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> inhibent l'activation de la voie mTORC1 (3) et que l'inhibition de mTORC1 est connue pour altérer la formation de ces deux types de granules d'ARN (4). De plus, les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> induisent la suractivation de la voie JNK qui est connue pour inhiber la formation des P-Bodies (5). Les mutants de PrP<sup>C</sup> altèrent également l'acquisition cellulaire du Zn<sup>2+</sup> (6) ce qui pourrait contribuer à l'inhibition des P-Bodies. Le Zn<sup>2+</sup> intracellulaire est important pour le processus d'agrégation initiant la formation des P-Bodies. La dérégulation des MVBs pourrait aussi contribuer à l'inhibition des P-Bodies puisque les deux entités peuvent s'associer et s'échanger du matériel (7), tout comme l'inhibition des P-Bodies altère la formation des GSs (8). L'inhibition des deux types de granules augmente la susceptibilité des cellules aux stress cellulaires et à l'apoptose (2 et 9).

### **Les maladies neurodégénératives associées à la dérégulation du système endolysosomal et du système d'ARNi.**

Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington sont associées à une dérégulation du système endolysosomal (décrite plus bas) et miARN (Ghose et al, Lee et al, 2012, Marti et al, 2010, Minones-Moyano et al, 2011, Savas et al, 2008). Par exemple, le mauvais repliement et l'agrégation de la protéine huntingtin affecte l'activité des petites GTPase Rab5 (Pal et al, 2006) et Rab11 (Li et al, 2008, Li et al, 2009, Li et al, Richards et al). Ces deux petites GTPase sont impliquées respectivement dans le transport des endosomes précoces et des endosomes de recyclage. Huntingtin possède comme PrP<sup>C</sup> des motifs GW/WG ce qui permettrait d'interagir avec les Ago (Gibbins et al, 2012, Savas et al, 2008). Il a été démontré que le knockdown de huntingtin ou l'expression d'un mutant pathologique diminue l'efficacité des miARN et altère la formation des P-Bodies (Savas et al, 2008). Il serait donc possible que le mauvais repliement et l'agrégation de huntingtin affecte sa capacité d'interagir avec les Ago et que la dérégulation du système endolysosomal observée dans la pathologie pourrait altérer l'efficacité des miARN comme le fait les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup>.

Le système endolysosomal est également affecté dans la maladie d'Alzheimer par la dérégulation des Rabs (Cossec et al, 2010, Ginsberg et al, 2010, Ginsberg et al, 2011, Ginsberg et al, 2010, Jiang et al, 2010, Yuyama & Yanagisawa, 2009). De plus, les oligomères de l'amyloïde bêta ont la capacité d'induire un stress au RE et d'altérer le système endolysosomal (Umeda et al, 2011). Il serait donc plausible que le dysfonctionnement du système endolysosomal puisse induire une dérégulation de l'efficacité des miARN. De plus, il est clairement établi que PrP<sup>C</sup> a un rôle important dans la toxicité reliée à l'Alzheimer (Fluharty et al, 2013, Guillot-Sestier et al, 2012, Kudo et al, 2012, Rushworth et al, 2013). Il serait intéressant d'investiguer si le stress au RE induit par les oligomères de l'amyloïde bêta favoriserait l'expression et/ou la mauvaise translocation de PrP<sup>C</sup> au RE (CyPrP et PrP<sup>Ctm</sup>) ce qui affecterait l'efficacité des miARN.



PrP<sup>C</sup> régule l'expression de deux protéines reliées à la maladie de Parkinson (Parkin et  $\alpha$ -synucléine) (Kralovicova et al, 2009), mais que les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de ces deux protéines par PrP<sup>C</sup> est encore inconnu. Il serait plausible que le nouveau rôle de PrP<sup>C</sup> dans l'efficacité des miARN contribue à la régulation de l'expression de ces deux protéines associée à la maladie de Parkinson. De plus, plusieurs études ont observées une augmentation du stress au RE dans la maladie de Parkinson (Arduino et al, 2009, Colla et al, 2012a, Ryu et al, 2002, Smith et al, 2005). Ce stress cellulaire pourrait affecter la topologie de PrP<sup>C</sup> (CyPrP et PrP<sup>Ctm</sup>) ce qui altérerait sa fonction de régulateur des miARN. Il est connu que les mutations familiales dans la protéine LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) sont aussi associées à la maladie de Parkinson (Alegre-Abarrategui et al, 2008, Alegre-Abarrategui & Wade-Martins, 2009, Higashi et al, 2009, Sloan et al, 2012, Vitte et al, 2010) et impliqueraient une diminution de l'efficacité des miARN et une dérégulation du système endosomal. Il a été démontré que la protéine LRRK2 et ses mutants familiaux interagissent avec le RISC (protéine Ago) mais contrairement à la forme sauvage, les mutants familiaux de LRRK2 diminuent l'efficacité des miARN (Gehrke et al, 2010). Également, les mutants familiaux de LRRK2 induisent un dysfonctionnement du système endolysosomal (Alegre-Abarrategui & Wade-Martins, 2009, Gehrke et al, 2010, Higashi et al, 2009, Sloan et al, 2012). Il serait donc intéressant d'investiguer le rôle de la dérégulation du système endolysosomal dans la diminution de l'efficacité des miARN par les mutants familiaux de LRRK2.

En résumé, la neurotoxicité induite dans plusieurs maladies neurodégénératives est associée soit à une dérégulation du système endolysosomal et d'ARNi, à l'augmentation du stress au RE ou encore à l'expression de PrP<sup>C</sup>. Nous proposons que ces différentes voies de toxicités induites dans les maladies neurodégénératives aient tous la capacité d'affecter l'activité du système d'ARNi comme dans le cas des ESTs.

### **Implication de la réponse au stress dans les maladies neurodégénératives.**

Les formes mal repliées des protéines impliquées dans les principales maladies neurodégénératives induisent un stress au RE et/ou l'activation de la kinase de stress PERK menant à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Atwal & Truant, 2008, Colla et al, 2012b, Hoozemans et al, 2005, Hoozemans et al, 2007, Hoozemans et al, 2009, Jiang et al, 2012, Lee et al, 2012, O'Connor et al, 2008, Salminen et al, 2009, Vidal & Hetz, 2012). De plus, elles peuvent induire l'activation de la kinase de stress PKR (Bando et al, 2005, Bose et al, 2011, Bullido et al, 2008, Couturier et al, 2010, Morel et al, 2009, Mouton-Liger et al, 2012, Onuki et al, 2004, Paquet et al, 2009, Peel & Bredesen, 2003, Peel, 2004). Pour la maladie d'Alzheimer, il a été suggéré que l'activation de PKR est PACT dépendante puisque plusieurs études ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de PACT, l'activation de PKR et la neurodégénérescence (Paquet et al, 2012). Cependant, aucune étude n'a investigué si la formation des GSs en réponse à un stress cellulaire est affectée dans ces pathologies.

Certaines protéines impliquées dans diverses maladies neurodégénératives ont été identifiées comme étant des composantes des GSs. Par exemple, les protéines TPD43 et FUS impliquées dans la sclérose amyotrophique latérale sont deux protéines constituant les GSs (Bentmann et al, 2013, Bosco et al, 2010, Daigle et al, 2013, Dewey et al, 2012, Gal et al, 2011, Ito & Suzuki, 2011, Li et al, 2013, Liu-Yesucevitz et al, 2010, Parker et al, 2012, Vance et al, 2013). De plus, il a été démontré récemment que la protéine Tau est aussi associée avec les GSs (Castellani et al, 2011, Vanderweyde et al, 2012). Les différentes études suggèrent que les GSs sont des sites où s'initient la formation des formes toxiques et mal repliées de ces protéines. Cependant, aucune étude n'a déterminée si l'intégrité des GSs est affectée dans ces pathologies. Il est connu que l'intégrité des GSs peut être affectée dans certaines circonstances augmentant ainsi la susceptibilité des cellules à la mort cellulaire (Fujimura et al, 2012). Il serait donc important de vérifier si l'intégrité des GSs est affectée dans ces pathologies neurodégénératives. Nous proposons que l'altération de la formation des GSs puisse être un mécanisme général de neurotoxicité des maladies neurodégénératives.

## **CONCLUSIONS**

Mes études de doctorat ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle de PrP<sup>C</sup> dans la régulation de l'activité des ARNi qui a potentiellement des implications dans diverses pathologies tel que le cancer, les ESTs et d'autres maladies neurodégénératives. Une meilleure compréhension et caractérisation du rôle de PrP<sup>C</sup> dans l'efficacité des miARN pourrait contribuer au développement de médicaments ou de thérapies afin d'arrêter la progression de la maladie et même de la renverser. Nous avons mis en évidence que la réponse au stress PACT/PKR/eIF2 $\alpha$  dépendante est activée par les mutants de PrP<sup>C</sup> mais que la formation de deux types de granules, les GSs et les P-Bodies, est inhibé par ces mêmes mutants et par l'infection chronique aux PrP<sup>Sc</sup>. Nous proposons que cette dérégulation de la réponse au stress soit un mécanisme général de neurotoxicité relié à toutes les ESTs et possiblement à plusieurs autres maladies neurodégénératives. Une meilleure compréhension des mécanismes de neurotoxicité est cruciale afin de développer des médicaments ou thérapies contre ces maladies neurodégénératives qui sont en pleines expansion dans les pays industrialisés. Plus particulièrement, l'inhibition de la voie mTORC1 et l'activation de PACT par les formes mal repliées de PrP<sup>C</sup> pourraient les mécanismes centraux pour la dérégulation de ces deux voies.

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie mes collègues de travail qui m'ont toujours apporté des suggestions et commentaires qui m'ont fait évoluer en tant que scientifique. Je remercie en particulier Ali qui est devenu un ami avec les années. Il m'a toujours encouragé et remonté le moral lors de moments difficiles. Je remercie les assistants de recherche, Guillaume et Julie, qui m'ont aidé dans la préparation et la correction des articles. Je remercie mon directeur de recherche, Dr Xavier Roucou, qui m'a accepté dans son laboratoire lors de ma maîtrise et qui m'a permis d'évoluer en tant que scientifique, m'a supporté financièrement et m'a permis d'assister à de nombreuses conférences. Je serai toujours reconnaissant de son appui et son support qui m'a donné. Enfin, je voudrais remercier les évaluateurs de ma thèse pour avoir acceptés de juger ma thèse et ma soutenance.

## RÉFÉRENCES

- Aguzzi A (2005) Cell biology. Prion toxicity: all sail and no anchor. *Science* 308: 1420-1421
- Aguzzi A & Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64: 783-790
- Aguzzi A & Steele AD (2009) Prion topology and toxicity. *Cell* 137: 994-6
- Akowitz A, Manuelidis EE, & Manuelidis L (1993) Protected endogenous retroviral sequences copurify with infectivity in experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Virol* 130: 301-316
- Akowitz A, Sklaviadis T, & Manuelidis L (1994) Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nucleic Acids Res* 22: 1101-1107
- Alais S, Simoes S, Baas D, Lehmann S, Raposo G, Darlix JL, & Leblanc P (2008) Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100: 603-615
- Alegre-Abarrategui J, Ansorge O, Esiri M, & Wade-Martins R (2008) LRRK2 is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34: 272-83
- Alegre-Abarrategui J & Wade-Martins R (2009) Parkinson disease, LRRK2 and the endocytic-autophagic pathway. *Autophagy* 5: 1208-10
- Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, & Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 2697-2706
- Ambros V & Chen X (2007) The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 134: 1635-1641
- Anderson L, Rossi D, Linehan J, Brandner S, & Weissmann C (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: 3644-3649
- Anderson P & Kedersha N (2009) RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 430-436
- Anderson P & Kedersha N (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 33: 141-150

- Anderson P & Kedersha N (2006) RNA granules. *J Cell Biol* 172: 803-808
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, & Brundin P (2010) Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 9: 1128-1138
- Arduino DM, Esteves AR, Cardoso SM, & Oliveira CR (2009) Endoplasmic reticulum and mitochondria interplay mediates apoptotic cell death: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int* 55: 341-348
- Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, & Takekawa M (2008) Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* 10: 1324-1332
- Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, & Mayer RJ (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organites in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol* 176: 403-11
- Ashok A & Hegde RS (2009) Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. *PLoS Pathog* 5: e1000479
- Ashok A & Hegde RS (2006) Prions and retroviruses: an endosomal rendezvous? *EMBO Rep* 7: 685-687
- Atwal RS & Truant R (2008) A stress sensitive ER membrane-association domain in Huntingtin protein defines a potential role for Huntingtin in the regulation of autophagy. *Autophagy* 4: 91-93
- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, & Voinnet O Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24: 904-15
- Babst M (2011) MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol* 23: 452-457
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, & Pasquinelli AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122: 553-563
- Baguet A, Degot S, Cougot N, Bertrand E, Chenard MP, Wendling C, Kessler P, Le Hir H, Rio MC, & Tomasetto C (2007) The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly. *J Cell Sci* 120: 2774-2784
- Baillat D & Shiekhattar R (2009) Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins. *Mol Cell Biol* 29: 4144-55

Bando Y, Onuki R, Katayama T, Manabe T, Kudo T, Taira K, & Tohyama M (2005) Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem Int* 46: 11-18

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, & Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428

Beaudoin S, Vanderperre B, Grenier C, Tremblay I, Leduc F, & Roucou X (2009) 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. *Biochim Biophys Acta* 1793: 335-345

Beckham CJ, Light HR, Nissan TA, Ahlquist P, Parker R, & Noueiry A (2007) Interactions between brome mosaic virus RNAs and cytoplasmic processing bodies. *J Virol* 81: 9759-9768

Beckham CJ & Parker R (2008) P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe* 3: 206-212

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, & Izaurralde E (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20: 1885-1898

Beliakova-Bethell N, Beckham C, Giddings TH, Jr, Winey M, Parker R, & Sandmeyer S (2006) Virus-like particles of the Ty3 retrotransposon assemble in association with P-body components. *RNA* 12: 94-101

Bellingham SA, Coleman BM, & Hill AF Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*

Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, & Hill AF (2012) Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 3: 124

Belosi B, Gaggelli E, Guerrini R, Kozlowski H, Luczkowski M, Mancini FM, Remelli M, Valensin D, & Valensin G (2004) Copper binding to the neurotoxic peptide PrP106-126: thermodynamic and structural studies. *Chembiochem* 5: 349-359

Bence NF, Sampat RM, & Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-1555

Bentmann E, Haass C, & Dormann D (2013) Stress granules in neurodegeneration - lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J*

Bentwich I (2005) Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett* 579: 5904-5910

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, & Bentwich Z (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37: 766-770

Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, Fan J, Thomas AA, Santos TG, Mohammad AH, Roffe M, Calder MD, Nikolova S, Hajj GN, Guimaraes AL, Massensini AR, Welch I, Betts DH, Gros R, Drangova M, Watson AJ, Bartha R, Prado VF et al (2013) Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB J*

Beranger F, Mange A, Goud B, & Lehmann S (2002) Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem* 277: 38972-38977

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, & Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366

Bhupanapadu Sunkesula SR, Luo X, Das D, Singh A, & Singh N (2010) Iron content of ferritin modulates its uptake by intestinal epithelium: implications for co-transport of prions. *Mol Brain* 3: 14-6606-3-14

Biasini E, Medrano AZ, Thellung S, Chiesa R, & Harris DA (2008) Multiple biochemical similarities between infectious and non-infectious aggregates of a prion protein carrying an octapeptide insertion. *J Neurochem* 104: 1293-1308

Biasini E, Tapella L, Restelli E, Pozzoli M, Massignan T, & Chiesa R (2010) The hydrophobic core region governs mutant prion protein aggregation and intracellular retention. *Biochem J* 430: 477-486

Biasini E, Unterberger U, Solomon IH, Massignan T, Senatore A, Bian H, Voigtlaender T, Bowman FP, Bonetto V, Chiesa R, Luebke J, Toselli P, & Harris DA (2013) A mutant prion protein sensitizes neurons to glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci* 33: 2408-2418

Bieschke J, Weber P, Sarafoff N, Beekes M, Giese A, & Kretzschmar H (2004) Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12207-12211

Blumenthal J & Ginzburg I (2008) Zinc as a translation regulator in neurons: implications for P-body aggregation. *J Cell Sci* 121: 3253-3260



Bolea R, Hortells P, Martin-Burriel I, Vargas A, Ryffel B, Monzon M, & Badiola JJ (2010) Consequences of dietary manganese and copper imbalance on neuronal apoptosis in a murine model of scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36: 300-311

Bommer UA, Borovjagin AV, Greagg MA, Jeffrey IW, Russell P, Laing KG, Lee M, & Clemens MJ (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: 478-496

Bommer UA, Kraft R, Kurzchalia TV, Price NT, & Proud CG (1991) Amino acid sequence analysis of the beta- and gamma-subunits of eukaryotic initiation factor eIF-2. Identification of regions interacting with GTP. *Biochim Biophys Acta* 1079: 308-315

Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ, Jr, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH, Jr, & Hayward LJ (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 19: 4160-4175

Bose A, Mouton-Liger F, Paquet C, Mazot P, Vigny M, Gray F, & Hugon J (2011) Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 21: 189-200

Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, & Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343

Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, & Aguzzi A (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13: 310-318

Brown DR (2004) Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol Dis* 15: 534-543

Brown DR (2003) Prion protein expression modulates neuronal copper content. *J Neurochem* 87: 377-385

Brown DR (1999) Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J Neurosci Res* 58: 717-725

Brown DR, Nicholas RS, & Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* 67: 211-224

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, & Kretzschmar H (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, & Kretzschmar HA (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146: 104-112

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, & Jones IM (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344 Pt 1: 1-5

Brown LR & Harris DA (2003) Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem* 87: 353-363

Brownawell AM & Macara IG (2002) Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* 156: 53-64

Brundin P, Melki R, & Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 301-307

Bucciantini M, Nosi D, Forzan M, Russo E, Calamai M, Pieri L, Formigli L, Quercioli F, Soria S, Pavone F, Savistchenko J, Melki R, & Stefani M (2012) Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *FASEB J* 26: 818-831

Buchan JR, Muhlrad D, & Parker R (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 183: 441-455

Buchan JR & Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36: 932-941

Budka H (2000) Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Arch Virol Suppl* (16): 135-142

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: 416-422

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, & Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582

Bullido MJ, Martinez-Garcia A, Tenorio R, Sastre I, Munoz DG, Frank A, & Valdivieso F (2008) Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29: 1160-1166

Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, Lario P, Avdievich NI, Antholine WE, Olmstead MM, Vrielink A, Gerfen GJ, Peisach J, Scott WG, & Millhauser GL (2002) Molecular features

of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* 41: 3991-4001

Burns CS, Aronoff-Spencer E, Legname G, Prusiner SB, Antholine WE, Gerfen GJ, Peisach J, & Millhauser GL (2003) Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* 42: 6794-6803

Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN, Machado CF, Pinto Arantes C, Magalhaes AC, Vieira Mde P, Americo TA, Massensini AR, Priola SA, Vorberg I, Gomez MV, Linden R, Prado VF, Martins VR, & Prado MA (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci* 28: 6691-6702

Cai X, Hagedorn CH, & Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966

Canello T, Friedman-Levi Y, Mizrahi M, Binyamin O, Cohen E, Frid K, & Gabizon R (2012) Copper is toxic to PrP-ablated mice and exacerbates disease in a mouse model of E200K genetic prion disease. *Neurobiol Dis* 45: 1010-1017

Cargnello M, Tcherkezian J, Dorn JF, Huttlin EL, Maddox PS, Gygi SP, & Roux PP (2012) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly. *Mol Cell Biol* 32: 4572-4584

Carimalo J, Cronier S, Petit G, Peyrin JM, Boukhtouche F, Arbez N, Lemaigre-Dubreuil Y, Brugg B, & Miquel MC (2005) Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection. *Eur J Neurosci* 21: 2311-2319

Carp RI, Meeker HC, Caruso V, & Sersen E (1999) Scrapie strain-specific interactions with endogenous murine leukaemia virus. *J Gen Virol* 80 ( Pt 1): 5-10

Carthew RW & Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655

Castellani RJ, Gupta Y, Sheng B, Siedlak SL, Harris PL, Coller JM, Perry G, Lee HG, Tabaton M, Smith MA, Wang X, & Zhu X (2011) A novel origin for granulovacuolar degeneration in aging and Alzheimer's disease: parallels to stress granules. *Lab Invest* 91: 1777-1786

Caughey B (1991) In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 172: 93-107

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, & Chesebro B (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* 63: 175-181

- Chakrabarti O, Ashok A, & Hegde RS (2009) Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem Sci* 34: 287-95
- Chakrabarti O & Hegde RS (2009) Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* 137: 1136-47
- Chakrabarti O, Rane NS, & Hegde RS (2011) Cytosolic aggregates perturb the degradation of nontranslocated secretory and membrane proteins. *Mol Biol Cell* 22: 1625-1637
- Checkley MA, Nagashima K, Lockett SJ, Nyswaner KM, & Garfinkel DJ (2010) P-body components are required for Ty1 retrotransposition during assembly of retrotransposition-competent virus-like particles. *Mol Cell Biol* 30: 382-398
- Chekulaeva M & Filipowicz W (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 21: 452-460
- Chekulaeva M, Filipowicz W, & Parker R (2009) Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* 15: 794-803
- Chekulaeva M, Mathys H, Zipprich JT, Attig J, Colic M, Parker R, & Filipowicz W (a) miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* 18: 1218-26
- Chekulaeva M, Parker R, & Filipowicz W (b) The GW/WG repeats of *Drosophila* GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated repression. *Nucleic Acids Res* 38: 6673-83
- Chen JJ (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 109: 2693-2699
- Chen K & Rajewsky N (2007) The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 8: 93-103
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, & Schachner M (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22: 227-233
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, & Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744
- Cheng Y, Tao L, Xu J, Li Q, Yu J, Jin Y, Chen Q, Xu Z, Zou Q, & Liu X (2013) CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Mol Carcinog*

Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, & Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308: 1435-1439

Chich JF, Chapuis C, Henry C, Vidic J, Rezaei H, & Noinville S (2010) Vesicle permeabilization by purified soluble oligomers of prion protein: a comparative study of the interaction of oligomers and monomers with lipid membranes. *J Mol Biol* 397: 1017-1030

Chiesa R, Drisaldi B, Quaglio E, Migheli A, Piccardo P, Ghetti B, & Harris DA (2000) Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5574-5579

Chiesa R & Harris DA (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol Dis* 8: 743-763

Chiesa R, Piccardo P, Biasini E, Ghetti B, & Harris DA (2008) Aggregated, wild-type prion protein causes neurological dysfunction and synaptic abnormalities. *J Neurosci* 28: 13258-13267

Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, & Harris DA (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21: 1339-1351

Chiesa R, Piccardo P, Quaglio E, Drisaldi B, Si-Hoe SL, Takao M, Ghetti B, & Harris DA (2003) Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J Virol* 77: 7611-7622

Christensen HM, Dikranian K, Li A, Baysac KC, Walls KC, Olney JW, Roth KA, & Harris DA (2010) A highly toxic cellular prion protein induces a novel, nonapoptotic form of neuronal death. *Am J Pathol* 176: 2695-2706

Chu CY & Rana TM (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4: e210

Cohen E & Taraboulos A (2003) Scrapie-like prion protein accumulates in aggresomes of cyclosporin A-treated cells. *EMBO J* 22: 404-417

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, & Brentani RR (2006) The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur J Neurosci* 24: 3255-3264

Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL, & Lee MK (2012a) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32: 3306-3320

Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL, & Lee MK (2012b) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32: 3306-3320

Colling SB, Collinge J, & Jefferys JG (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett* 209: 49-52

Collinge J (1997) Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 6: 1699-1705

Collinge J & Palmer MS (1994) Molecular genetics of human prion diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343: 371-378

Collinge J, Palmer MS, & Dryden AJ (1991) Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337: 1441-1442

Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, & Alessandro R (2013) Exosomes as intercellular signaling organites involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci* 14: 5338-5366

Cosentino GP, Venkatesan S, Serluca FC, Green SR, Mathews MB, & Sonenberg N (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9445-9449

Cossec JC, Marquer C, Panchal M, Lazar AN, Duyckaerts C, & Potier MC (2010) Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. *Biochim Biophys Acta* 1801: 839-45

Costanzo M & Zurzolo C (2013) The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 452: 1-17

Cougot N, Babajko S, & Seraphin B (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 165: 31-40

Couturier J, Morel M, Pontcharraud R, Gontier V, Fauconneau B, Paccalin M, & Page G (2010) Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (A $\beta$ )-treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice. *J Biol Chem* 285: 1272-1282

Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, & Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis* 19: 255-265

Crozet C, Beranger F, & Lehmann S (2008) Cellular pathogenesis in prion diseases. *Vet Res* 39: 44

Daher A, Laraki G, Singh M, Melendez-Pena CE, Bannwarth S, Peters AH, Meurs EF, Braun RE, Patel RC, & Gatignol A (2009) TRBP control of PACT-induced phosphorylation of protein kinase R is reversed by stress. *Mol Cell Biol* 29: 254-265

Daigle JG, Lanson NA, Jr, Smith RB, Casci I, Maltare A, Monaghan J, Nichols CD, Kryndushkin D, Shewmaker F, & Pandey UB (2013) RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations. *Hum Mol Genet* 22: 1193-1205

Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R, Anderson P, & Liu JO (2006) Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ -independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem* 281: 32870-32878

Daniels SM & Gatignol A (2012) The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 652-666

Das D, Luo X, Singh A, Gu Y, Ghosh S, Mukhopadhyay CK, Chen SG, Sy MS, Kong Q, & Singh N (2010) Paradoxical role of prion protein aggregates in redox-iron induced toxicity. *PLoS One* 5: e11420

Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, & Glabe CG (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280: 17294-17300

Deriziotis P, Andre R, Smith DM, Gould R, Kinghorn KJ, Kristiansen M, Nathan JA, Rosenzweig R, Krutauz D, Glickman MH, Collinge J, Goldberg AL, & Tabrizi SJ (2011) Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. *EMBO J* 30: 3065-3077

Dery MA, Jodoin J, Ursini-Siegel J, Aleynikova O, Ferrario C, Hassan S, Basik M, & Leblanc AC (2013) Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Res* 15: R22

Detzer A, Overhoff M, Wunsche W, Rompf M, Turner JJ, Ivanova GD, Gait MJ, & Sczakiel G (2009) Increased RNAi is related to intracellular release of siRNA via a covalently attached signal peptide. *RNA* 15: 627-636

- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, & Yu G (2012) TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res* 1462: 16-25
- Didonna A (2013) Prion protein and its role in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 18: 209-230
- Didonna A & Legname G (2010) Aberrant ERK 1/2 complex activation and localization in scrapie-infected GT1-1 cells. *Mol Neurodegener* 5: 29-1326-5-29
- Ding L, Spencer A, Morita K, & Han M (2005) The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19: 437-447
- Doench JG & Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18: 504-511
- Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, & Dyson HJ (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: 13452-13457
- Dores MR, Paing MM, Lin H, Montagne WA, Marchese A, & Trejo J (2012) AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Mol Biol Cell* 23: 3612-3623
- Dowlatshahi DP, Sandrin V, Vivona S, Shaler TA, Kaiser SE, Melandri F, Sundquist WI, & Kopito RR (2012) ALIX is a Lys63-specific polyubiquitin binding protein that functions in retrovirus budding. *Dev Cell* 23: 1247-1254
- Dron M, Dandoy-Dron F, Farooq Salamat MK, & Laude H (2009) Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. *J Gen Virol* 90: 2050-2060
- Du L, Rao G, Wang H, Li B, Tian W, Cui J, He L, Laffin B, Tian X, Hao C, Liu H, Sun X, Zhu Y, Tang DG, Mehrpour M, Lu Y, & Chen Q (2013) CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res* 73: 2682-2694
- Durand S, Cougot N, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, Grierson DS, Bertrand E, Tazi J, & Lejeune F (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: 1145-1160
- Eisinger-Mathason TS, Andrade J, Groehler AL, Clark DE, Muratore-Schroeder TL, Pasic L, Smith JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Macara IG, & Lannigan DA (2008) Codependent



functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell* 31: 722-736

Emara MM, Fujimura K, Sciaranghella D, Ivanova V, Ivanov P, & Anderson P (2012) Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2alpha phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 763-769

Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, & Vekrellis K (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 30: 6838-6851

Endo T, Groth D, Prusiner SB, & Kobata A (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28: 8380-8388

Ermolayev V, Cathomen T, Merk J, Friedrich M, Hartig W, Harms GS, Klein MA, & Flechsig E (2009) Impaired axonal transport in motor neurons correlates with clinical prion disease. *PLoS Pathog* 5: e1000558

Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, Oda K, Schneider B, Mouillet-Richard S, Launay JM, & Kellermann O (2009) The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. *PLoS One* 4: e6497

Ersdal C, Goodsir CM, Simmons MM, McGovern G, & Jeffrey M (2009) Abnormal prion protein is associated with changes of plasma membranes and endocytosis in bovine spongiform encephalopathy (BSE)-affected cattle brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 259-71

Ettaiche M, Pichot R, Vincent JP, & Chabry J (2000) In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. *J Biol Chem* 275: 36487-36490

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, & Izaurralde E (2007a) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27: 3970-3981

Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, & Izaurralde E (2007b) Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21: 2558-2570

Eulalio A, Tritschler F, & Izaurralde E (2009) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 15: 1433-42

Fagard R & London IM (1981) Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 866-870

Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, & Bartel DP (2005) The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310: 1817-1821

Farrelly PV, Kenna BL, Laohachai KL, Bahadi R, Salmons M, Forloni G, & Kourie JI (2003) Quinacrine blocks PrP (106-126)-formed channels. *J Neurosci Res* 74: 934-941

Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, & Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9683-9688

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, & Simonsen A (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179: 485-500

Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, & Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15: 1255-1264

Florio T, Paludi D, Villa V, Principe DR, Corsaro A, Millo E, Damonte G, D'Arrigo C, Russo C, Schettini G, & Aceto A (2003) Contribution of two conserved glycine residues to fibrillogenesis of the 106-126 prion protein fragment. Evidence that a soluble variant of the 106-126 peptide is neurotoxic. *J Neurochem* 85: 62-72

Fluharty BR, Biasini E, Stravalaci M, Sclip A, Diomedea L, Balducci C, La Vitola P, Messa M, Colombo L, Forloni G, Borsello T, Gobbi M, & Harris DA (2013) An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-beta oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. *J Biol Chem* 288: 7857-7866

Fournier MJ, Coudert L, Mellaoui S, Adjibade P, Gareau C, Cote MF, Sonenberg N, Gaudreault RC, & Mazroui R (2013) Inactivation of the mTORC1-Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Pathway Alters Stress Granule Formation. *Mol Cell Biol* 33: 2285-2301

Fournier MJ, Gareau C, & Mazroui R (2010) The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int* 10: 12-2867-10-12

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, & Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105

Frost B & Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 11: 155-159

Fujimura K, Sasaki AT, & Anderson P (2012) Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules. *Nucleic Acids Res* 40: 8099-8110

Fukuhara N, Ebert J, Unterholzner L, Lindner D, Izaurralde E, & Conti E (2005) SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell* 17: 537-547

Gabus C, Derrington E, Leblanc P, Chnaiderman J, Dormont D, Swietnicki W, Morillas M, Surewicz WK, Marc D, Nandi P, & Darlix JL (2001) The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* 276: 19301-19309

Gajdusek DC & Alpers M (1972) Genetic studies in relation of kuru. I. Cultural, historical, and demographic background. *Am J Hum Genet* 24: Suppl:1-38

Gal J, Zhang J, Kwinter DM, Zhai J, Jia H, Jia J, & Zhu H (2011) Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants. *Neurobiol Aging* 32: 2323.e27-2323.e40

Galabru J & Hovanessian A (1987) Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem* 262: 15538-15544

Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, & Chen SG (2003) Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66: 213-239

Gan J, Shaw G, Tropea JE, Waugh DS, Court DL, & Ji X (2008) A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Mol Microbiol* 67: 143-154

Gareau C, Fournier MJ, Filion C, Coudert L, Martel D, Labelle Y, & Mazroui R (2011) p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis. *PLoS One* 6: e20254

Garnett AP & Viles JH (2003) Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem* 278: 6795-6802

Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, & Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20: 5863-5875

Gawinecka J, Cardone F, Asif AR, De Pascalis A, Wemheuer WM, Schulz-Schaeffer WJ, Pocchiari M, & Zerr I (2012) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease subtype-specific alterations of the brain proteome: impact on Rab3a recycling. *Proteomics* 12: 3610-3620

Gehrke S, Imai Y, Sokol N, & Lu B (2010) Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 466: 637-641

Ghetti B, Dlouhy SR, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B, Farlow MR, & Tagliavini F (1995) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol* 5: 61-75

Ghose J, Sinha M, Das E, Jana NR, & Bhattacharyya NP Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease. *PLoS One* 6: e23837

Gibbings D, Leblanc P, Jay F, Pontier D, Michel F, Schwab Y, Alais S, Lagrange T, & Voinnet O (2012) Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 19: 517-24, S1

Gibbings D, Mostowy S, Jay F, Schwab Y, Cossart P, & Voinnet O (2013) Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol*

Gibbings D & Voinnet O (2010) Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends Cell Biol* 20: 491-501

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, & Voinnet O (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11: 1143-9

Gibson TJ (2001) RuNAway Disease: A two cycle model for transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) wherein SINE proliferation drives PrP overproduction. *Genome Biol* 2: Preprint 0006

Giese A, Buchholz M, Herms J, & Kretzschmar HA (2005) Mouse brain synaptosomes accumulate copper-67 efficiently by two distinct processes independent of cellular prion protein. *J Mol Neurosci* 27: 347-354

Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, & Anderson P (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15: 5383-5398

Gillieron J, Querbes W, Zeigerer A, Borodovsky A, Marsico G, Schubert U, Manygoats K, Seifert S, Andree C, Stoter M, Epstein-Barash H, Zhang L, Koteliensky V, Fitzgerald K, Fava E, Bickle M, Kalaidzidis Y, Akinc A, Maier M, & Zerial M (2013) Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol*

Ginsberg SD, Alldred MJ, Counts SE, Cataldo AM, Neve RL, Jiang Y, Wu J, Chao MV, Mufson EJ, Nixon RA, & Che S (a) (2010) Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons

implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry* 68: 885-93

Ginsberg SD, Mufson EJ, Alldred MJ, Counts SE, Wu J, Nixon RA, & Che S (b) (2011) Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 42: 102-10

Ginsberg SD, Mufson EJ, Counts SE, Wu J, Alldred MJ, Nixon RA, & Che S (c) (2010) Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22: 631-9

Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, & Aguzzi A (2005) Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 62: 545-552

Goedert M, Clavaguera F, & Tolnay M (2010) The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 33: 317-325

Goggin K, Beaudoin S, Grenier C, Brown AA, & Roucou X (2008) Prion protein aggregates are poly(A)<sup>+</sup> ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim Biophys Acta* 1783: 479-91

Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ, Jr, & Gajdusek DC (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: 10926-10930

Goldfarb LG, Mitrova E, Brown P, Toh BK, & Gajdusek DC (1990) Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. *Lancet* 336: 514-515

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, & Pendelbury WW (1992) Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258: 806-808

Gong J, Jellali A, Forster V, Mutterer J, Dubus E, Altmann WD, Sahel JA, Rendon A, & Picaud S (2007) The toxicity of the PrP<sup>106-126</sup> prion peptide on cultured photoreceptors correlates with the prion protein distribution in the mammalian and human retina. *Am J Pathol* 170: 1314-1324

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, & Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neurite outgrowth. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 85-92

Greenwood AD, Vincendeau M, Schmadicke AC, Montag J, Seifarth W, & Motzkus D (2011) Bovine spongiform encephalopathy infection alters endogenous retrovirus expression in distinct brain regions of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Mol Neurodegener* 6: 44-1326-6-44

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, & Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123: 631-640

Gregory RI, Chendrimada TP, & Shiekhattar R (2006) MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 342: 33-47

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, & Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-240

Gu Y, Fujioka H, Mishra RS, Li R, & Singh N (2002) Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem* 277: 2275-2286

Gu Y, Singh A, Bose S, & Singh N (2008) Pathogenic mutations in the glycosylphosphatidylinositol signal peptide of PrP modulate its topology in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 37: 647-656

Gu Y, Verghese S, Bose S, Mohan M, & Singh N (2007) Mutant prion protein D202N associated with familial prion disease is retained in the endoplasmic reticulum and forms 'curly' intracellular aggregates. *J Mol Neurosci* 32: 90-96

Gudkova DO, Panasyuk G, Nemazanyy IO, & Filonenko VV (2011) PI3K/mTOR-dependent signaling pathway as a possible regulator of processing body assembly *Biopolymers and Cell* 27: 369-369-372

Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Ferreira ST, Marzolo MP, Bauer C, Thevenet A, & Checler F (2012) alpha-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid beta (A $\beta$ )-associated cell death. *J Biol Chem* 287: 5021-5032

Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Ferreira ST, Marzolo MP, Bauer C, Thevenet A, & Checler F alpha-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid beta (A $\beta$ )-associated cell death. *J Biol Chem* 287: 5021-32

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, & Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-840

Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG, & Dargemont C (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278: 5505-5508

Gyllberg H, Lofgren K, Lindegren H, & Bedecs K (2006) Increased Src kinase level results in increased protein tyrosine phosphorylation in scrapie-infected neuronal cell lines. *FEBS Lett* 580: 2603-2608

Hafner-Bratkovic I, Bencina M, Fitzgerald KA, Golenbock D, & Jerala R (2012) NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL-1beta and neuronal toxicity. *Cell Mol Life Sci* 69: 4215-4228

Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffe M, Costa-Silva B, Lopes MH, Porto-Carreiro I, Rabachini T, Lima FR, Beraldo FH, Prado MM, Linden R, & Martins VR (2013) The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, & Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125: 887-901

Hanson PI & Cashikar A (2012) Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 337-362

Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, & Burlingame A (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274: 1-13

Harder A, Jendroska K, Kreuz F, Wirth T, Schafranka C, Karnatz N, Theallier-Janko A, Dreier J, Lohan K, Emmerich D, Cervos-Navarro J, Windl O, Kretzschmar HA, Nurnberg P, & Witkowski R (1999) Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet* 87: 311-316

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, & Ron D (2000a) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099-1108

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, & Ron D (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5: 897-904

Harris DA (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66: 71-85

Harris DA, Chiesa R, Drisaldi B, Quaglio E, Migheli A, Piccardo P, & Ghetti B (2003) A murine model of a familial prion disease. *Clin Lab Med* 23: 175-186

Harris DA, Chiesa R, Drisaldi B, Quaglio E, Migheli A, Piccardo P, & Ghetti B (2000) A transgenic model of a familial prion disease. *Arch Virol Suppl* (16): 103-112

Harris DA & True HL (2006) New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* 50: 353-357

Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, & Takeda A (2011) The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. *PLoS One* 6: e29460

Havens MA, Reich AA, Duelli DM, & Hastings ML (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 40: 4626-4640

Hawkins PG & Morris KV (2008) RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 7: 602-607

Head MW, Corbin E, & Goldman JE (1994) Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress. *J Cell Physiol* 159: 41-50

Henne WM, Buchkovich NJ, & Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Dev Cell* 21: 77-91

Heske J, Heller U, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2004) The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 5435-5443

Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, & Soto C (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22: 5435-5445

Hetz CA & Soto C (2006) Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Curr Mol Med* 6: 37-43

Higashi S, Moore DJ, Yamamoto R, Minegishi M, Sato K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Emson PC, Wada K, Dawson VL, Dawson TM, Arai H, & Iseki E (2009) Abnormal localization of leucine-rich repeat kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 994-1005



Holscher C, Bach UC, & Dobberstein B (2001) Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J Biol Chem* 276: 13388-13394

Hooper NM, Taylor DR, & Watt NT (2008) Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. *Biochem Soc Trans* 36: 1272-1276

Hoozemans JJ, van Haastert ES, Eikelenboom P, de Vos RA, Rozemuller JM, & Scheper W (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 707-711

Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, & Scheper W (2009) The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol* 174: 1241-1251

Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, & Scheper W (2005) The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 110: 165-172

Hornemann S, von Schroetter C, Damberger FF, & Wuthrich K (2009) Prion protein-detergent micelle interactions studied by NMR in solution. *J Biol Chem* 284: 22713-22721

Hornshaw MP, McDermott JR, & Candy JM (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 621-629

Hortells P, Monleon E, Acin C, Vargas A, Vasseur V, Salomon A, Ryffel B, Cesbron JY, Badiola JJ, & Monzon M (2010) The effect of metal imbalances on scrapie neurodegeneration. *Zoonoses Public Health* 57: 358-366

Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB, & Gabizon R (1991) Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 324: 1091-1097

Hsiao K & Prusiner SB (1990) Inherited human prion diseases. *Neurology* 40: 1820-1827

Hsiao K, Scott M, Foster D, DeArmond SJ, Groth D, Serban H, & Prusiner SB (1991) Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline---leucine substitution. *Ann N Y Acad Sci* 640: 166-170

Hu S, Claud EC, Musch MW, & Chang EB (2010) Stress granule formation mediates the inhibition of colonic Hsp70 translation by interferon-gamma and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G481-92

- Huang P, Lian F, Wen Y, Guo C, & Lin D (2013) Prion protein oligomer and its neurotoxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45: 442-451
- Huber R, Deboer T, & Tobler I (2002) Sleep deprivation in prion protein deficient mice sleep deprivation in prion protein deficient mice and control mice: genotype dependent regional rebound. *Neuroreport* 13: 1-4
- Hurley JH (2010) The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 463-487
- Hurley JH & Odorizzi G (2012) Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 14: 654-655
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, & Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838
- Ihara Y, Morishima-Kawashima M, & Nixon R (2012) The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: 10.1101/cshperspect.a006361
- Ito D & Suzuki N (2011) Conjoint pathologic cascades mediated by ALS/FTLD-U linked RNA-binding proteins TDP-43 and FUS. *Neurology* 77: 1636-1643
- Ito T, Yang M, & May WS (1999) RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem* 274: 15427-15432
- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, Fritzler MJ, & Chan EK (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7: 1267-1274
- Jeong BH, Lee YJ, Carp RI, & Kim YS (2010) The prevalence of human endogenous retroviruses in cerebrospinal fluids from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Virol* 47: 136-142
- Ji X (2008) The mechanism of RNase III action: how dicer dices. *Curr Top Microbiol Immunol* 320: 99-116
- Jiang HY & Wek RC (2005) GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J* 385: 371-380
- Jiang Y, Lv H, Liao M, Xu X, Huang S, Tan H, Peng T, Zhang Y, & Li H (2012) GRP78 counteracts cell death and protein aggregation caused by mutant huntingtin proteins. *Neurosci Lett* 516: 182-187
- Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, & Nixon RA (2010) Alzheimer's-related endosome dysfunction

in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1630-5

Jiao J, Kim HY, Liu RR, Hogan CA, Sun K, Tam LM, & Gunn TM (2009a) Transgenic analysis of the physiological functions of Mahogunin Ring Finger-1 isoforms. *Genesis* 47: 524-534

Jiao J, Sun K, Walker WP, Bagher P, Cota CD, & Gunn TM (2009b) Abnormal regulation of TSG10101 in mice with spongiform neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1792: 1027-1035

Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, & Han J (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120: 623-634

Jobling MF, Huang X, Stewart LR, Barnham KJ, Curtain C, Volitakis I, Perugini M, White AR, Cherny RA, Masters CL, Barrow CJ, Collins SJ, Bush AI, & Cappai R (2001) Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry* 40: 8073-8084

Jodoin J, Laroche-Pierre S, Goodyer CG, & LeBlanc AC (2007) Defective retrotranslocation causes loss of anti-Bax function in human familial prion protein mutants. *J Neurosci* 27: 5081-91

Jodoin J, Misiewicz M, Makhijani P, Giannopoulos PN, Hammond J, Goodyer CG, & LeBlanc AC (2009) Loss of anti-Bax function in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome-associated prion protein mutants. *PLoS One* 4: e6647

Johnson CJ, Gilbert PU, Abrecht M, Baldwin KL, Russell RE, Pedersen JA, Aiken JM, & McKenzie D (2013) Low copper and high manganese levels in prion protein plaques. *Viruses* 5: 654-662

Juanes ME, Elvira G, Garcia-Grande A, Calero M, & Gasset M (2009) Biosynthesis of prion protein nucleocytoplasmic isoforms by alternative initiation of translation. *J Biol Chem* 284: 2787-2794

Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, Baekkeskov S, & Legname G (2005) Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem* 95: 1373-1386

Katamine S, Nishida N, Sugimoto T, Noda T, Sakaguchi S, Shigematsu K, Kataoka Y, Nakatani A, Hasegawa S, Moriuchi R, & Miyamoto T (1998) Impaired motor coordination in mice lacking prion protein. *Cell Mol Neurobiol* 18: 731-742

Katzmann DJ, Odorizzi G, & Emr SD (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905

Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Orom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, & Agami R (2007) RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131: 1273-1286

Kedersha N & Anderson P (2009) Regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 155-185

Kedersha N & Anderson P (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431: 61-81

Kedersha N & Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30: 963-969

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, & Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-884

Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, & Anderson P (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: 1431-1442

Keshet GI, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, & Gabizon R (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* 75: 1889-1897

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, & Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659

Kiesel P, Bodemer W, Gibson T, Zischler H, & Kaup FJ (2012) Prion infected rhesus monkeys to study differential transcription of Alu DNA elements and editing of Alu transcripts in neuronal cells and blood cells. *J Med Primatol* 41: 176-182

Kiesel P, Gibson TJ, Ciesielczyk B, Bodemer M, Kaup FJ, Bodemer W, Zischler H, & Zerr I (2011) Possible editing of Alu transcripts in blood cells of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). *J Toxicol Environ Health A* 74: 88-95

Kiesel P, Gibson TJ, Ciesielczyk B, Bodemer M, Kaup FJ, Bodemer W, Zischler H, & Zerr I (2010) Transcription of Alu DNA elements in blood cells of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). *Prion* 4: 87-93

- Kiesel P, Kues A, Kaup FJ, Bodemer W, Gibson TJ, & Zischler H (2012) A comparative analysis to study editing of small noncoding BC200- and Alu transcripts in brain of prion-inoculated rhesus monkeys (M. Mulatta). *J Toxicol Environ Health A* 75: 391-401
- Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin LS, & Li L (2007a) Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* 18: 1129-1142
- Kim K, Lee YS, & Carthew RW (2007b) Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* 13: 22-29
- Kim SJ, Rahbar R, & Hegde RS (2001) Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J Biol Chem* 276: 26132-26140
- Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, & Jang SK (2005) Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol* 25: 2450-2462
- Kim YK & Kim VN (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26: 775-783
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML, Jr, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, & Fonseca Moreira JC (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30: 1137-1144
- Kok KH, Ng MH, Ching YP, & Jin DY (2007) Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem* 282: 17649-17657
- Koscianska E, Starega-Roslan J, & Krzyzosiak WJ (2011) The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One* 6: e28548
- Kourie JI (2002) Prion channel proteins and their role in vacuolation and neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J* 31: 409-416
- Kourie JI & Henry CL (2001) Protein aggregation and deposition: implications for ion channel formation and membrane damage. *Croat Med J* 42: 359-374
- Kourie JI, Kenna BL, Tew D, Jobling MF, Curtain CC, Masters CL, Barnham KJ, & Cappai R (2003) Copper modulation of ion channels of PrP[106-126] mutant prion peptide fragments. *J Membr Biol* 193: 35-45
- Kovacs GG, Gelpi E, Strobel T, Ricken G, Nyengaard JR, Bernheimer H, & Budka H (2007) Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 628-36

- Kralovicova S, Fontaine SN, Alderton A, Alderman J, Ragnarsdottir KV, Collins SJ, & Brown DR (2009) The effects of prion protein expression on metal metabolism. *Mol Cell Neurosci* 41: 135-147
- Kren BT, Wong PY, Sarver A, Zhang X, Zeng Y, & Steer CJ (2009) MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol* 6: 65-72
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, & Hinnebusch AG (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: 5018-5030
- Kristiansen M, Deriziotis P, Dimcheff DE, Jackson GS, Ovaa H, Naumann H, Clarke AR, van Leeuwen FW, Menendez-Benito V, Dantuma NP, Portis JL, Collinge J, & Tabrizi SJ (2007) Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* 26: 175-188
- Kristiansen M, Messenger MJ, Klohn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, & Tabrizi SJ (2005) Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280: 38851-38861
- Krol J, Sobczak K, Wilczynska U, Drath M, Jasinska A, Kaczynska D, & Krzyzosiak WJ (2004) Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem* 279: 42230-42239
- Kudlicki W, Wettenhall RE, Kemp BE, Szyszka R, Kramer G, & Hardesty B (1987) Evidence for a second phosphorylation site on eIF-2 alpha from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett* 215: 16-20
- Kudo W, Lee HP, Zou WQ, Wang X, Perry G, Zhu X, Smith MA, Petersen RB, & Lee HG (2012) Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 21: 1138-1144
- Kwak PB & Tomari Y (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19: 145-151
- Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, & Issartel JP (2012) MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci* 17: 2508-2540
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, & Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858

- Landolt HP, Glatzel M, Blattler T, Achermann P, Roth C, Mathis J, Weis J, Tobler I, Aguzzi A, & Bassetti CL (2006) Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 66: 1418-1424
- Laplanche JL, Chatelain J, Launay JM, Gazengel C, & Vidaud M (1990) Deletion in prion protein gene in a Moroccan family. *Nucleic Acids Res* 18: 6745
- Laroche-Pierre S, Jodoin J, & LeBlanc AC (2009) Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. *J Neurochem* 108: 1019-1031
- Larsen LS, Beliakova-Bethell N, Bilanchone V, Zhang M, Lamsa A, Dasilva R, Hatfield GW, Nagashima K, & Sandmeyer S (2008) Ty3 nucleocapsid controls localization of particle assembly. *J Virol* 82: 2501-2514
- Lavut A & Raveh D (2012) Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genet* 8: e1002527
- Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J, Raposo G, & Darlix JL (2006) Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J* 25: 2674-2685
- Lee CT, Risom T, & Strauss WM (2007) Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol* 26: 209-218
- Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, Lee ST, Kim M, Ryu H, & Jung YK (2012) IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum Mol Genet* 21: 101-114
- Lee HP, Jun YC, Choi JK, Kim JI, Carp RI, & Kim YS (2005) Activation of mitogen-activated protein kinases in hamster brains infected with 263K scrapie agent. *J Neurochem* 95: 584-593
- Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, & Doudna JA (2013) Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res*
- Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, Acharya C, Ankener M, Baskin D, Cooper C, Yao H, Prusiner SB, & Hood LE (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 8: 1022-1037
- Lee KH, Jeong BH, Jin JK, Meeker HC, Kim JI, Carp RI, & Kim YS (2006) Scrapie infection activates the replication of ecotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia virus

(MuLV) in brains and spinal cords of senescence-accelerated mice: implication of MuLV in progression of scrapie pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 122-130

Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, & Prado MA (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79: 79-87

Lee KS, Raymond LD, Schoen B, Raymond GJ, Kett L, Moore RA, Johnson LM, Taubner L, Speare JO, Onwubiko HA, Baron GS, Caughey WS, & Caughey B (2007) Hemin interactions and alterations of the subcellular localization of prion protein. *J Biol Chem* 282: 36525-36533

Lee RC & Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864

Lee SJ, Jiko C, Yamashita E, & Tsukihara T (2011) Selective nuclear export mechanism of small RNAs. *Curr Opin Struct Biol* 21: 101-108

Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim JH, Huh JY, Yoon H, Park DK, Lim JY, Kim JM, Jeon D, Ryu H, Lee SK, Kim M, & Roh JK (2012) miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Ann Neurol* 72: 269-277

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, & Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419

Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, & Kim VN (2006a) Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 51-57

Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, & Kim VN (2006b) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25: 522-532

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, & Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060

Lee YJ & Baskakov IV (2013) The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation. *J Neurochem* 124: 310-322

Lee YJ, Savtchenko R, Ostapchenko VG, Makarava N, & Baskakov IV (2011) Molecular structure of amyloid fibrils controls the relationship between fibrillar size and toxicity. *PLoS One* 6: e20244



Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim do H, Cho IS, Nakahara K, Preall JB, Bellare P, Sontheimer EJ, & Carthew RW (2009) Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 11: 1150-6

Lehmann S (2002) Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol* 6: 187-192

Lehmann S & Harris DA (1996a) Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol Chem* 271: 1633-1637

Lehmann S & Harris DA (1996b) Two mutant prion proteins expressed in cultured cells acquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5610-5614

Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, & Martinez J (2006) Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7: 314-320

Lewis BP, Burge CB, & Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, & Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798

Lewis V & Hooper NM (2011) The role of lipid rafts in prion protein biology. *Front Biosci* 16: 151-168

Li C, Yu S, Nakamura F, Pentikainen OT, Singh N, Yin S, Xin W, & Sy MS (2010) Pro-prion binds filamin A, facilitating its interaction with integrin beta1, and contributes to melanomagenesis. *J Biol Chem* 285: 30328-30339

Li QQ, Sun YP, Ruan CP, Xu XY, Ge JH, He J, Xu ZD, Wang Q, & Gao WC (2011) Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2alpha-Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. *Cancer Sci* 102: 400-406

Li S, Peters GA, Ding K, Zhang X, Qin J, & Sen GC (2006) Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10005-10010

Li W, Simarro M, Kedersha N, & Anderson P (2004) FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. *Mol Cell Biol* 24: 10718-10732

Li X, Sapp E, Chase K, Comer-Tierney LA, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Valencia A, Esteves M, Aronin N, & Difiglia M (2009) Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 36: 374-83

- Li X, Sapp E, Valencia A, Kegel KB, Qin ZH, Alexander J, Masso N, Reeves P, Ritch JJ, Zeitlin S, Aronin N, & Difiglia M (2008) A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. *Neuroreport* 19: 1643-7
- Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Aronin N, & Difiglia M Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 30: 4552-61
- Li XL, Wang GR, Jing YY, Pan MM, Dong CF, Zhou RM, Wang ZY, Shi Q, Gao C, & Dong XP (2011a) Cytosolic PrP induces apoptosis of cell by disrupting microtubule assembly. *J Mol Neurosci* 43: 316-325
- Li Y, Cardona SM, Traister RS, & Lynch WP (2011b) Retrovirus-induced spongiform neurodegeneration is mediated by unique central nervous system viral targeting and expression of env alone. *J Virol* 85: 2060-2078
- Li YR, King OD, Shorter J, & Gitler AD (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol* 201: 361-372
- Lian SL, Li S, Abadal GX, Pauley BA, Fritzler MJ, & Chan EK (2009) The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *Rna* 15: 804-13
- Liao YC, Lebo RV, Clawson GA, & Smuckler EA (1986) Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233: 364-367
- Lin DT, Jodoin J, Baril M, Goodyer CG, & Leblanc AC (2008a) Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2001-12
- Lin SL, Kim H, & Ying SY (2008b) Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA). *Front Biosci* 13: 2216-2230
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, & Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88: 673-728
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, & Hannon GJ (2005a) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7: 1261-1266
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, & Parker R (2005b) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7: 719-723

Liu S, Suragani RN, Wang F, Han A, Zhao W, Andrews NC, & Chen JJ (2007) The function of heme-regulated eIF2alpha kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. *J Clin Invest* 117: 3296-3305

Liu Y, Ye X, Jiang F, Liang C, Chen D, Peng J, Kinch LN, Grishin NV, & Liu Q (2009) C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325: 750-753

Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, Zaarur N, McKee A, Bowser R, Sherman M, Petrucelli L, & Wolozin B (2010) Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One* 5: e13250

Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, & Nicoll RA (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2403-2407

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, & Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25: 11330-11339

Lopes MH & Santos TG (2012) Prion potency in stem cells biology. *Prion* 6: 142-146

Lotscher M, Recher M, Lang KS, Navarini A, Hunziker L, Santimaria R, Glatzel M, Schwarz P, Boni J, & Zinkernagel RM (2007a) Induced prion protein controls immune-activated retroviruses in the mouse spleen. *PLoS One* 2: e1158

Lotscher M, Recher M, Lang KS, Navarini A, Hunziker L, Santimaria R, Glatzel M, Schwarz P, Boni J, & Zinkernagel RM (2007b) Induced prion protein controls immune-activated retroviruses in the mouse spleen. *PLoS One* 2: e1158

Lu C, Contreras X, & Peterlin BM (2011) P bodies inhibit retrotransposition of endogenous intracisternal a particles. *J Virol* 85: 6244-6251

Lu C, Luo Z, Jager S, Krogan NJ, & Peterlin BM (2012) Moloney leukemia virus type 10 inhibits reverse transcription and retrotransposition of intracisternal a particles. *J Virol* 86: 10517-10523

Lugaresi E, Tobler I, Gambetti P, & Montagna P (1998) The pathophysiology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 8: 521-526

Lukiw WJ, Dua P, Pogue AI, Eicken C, & Hill JM (2011) Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-

Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J Toxicol Environ Health A* 74: 1460-1468

Lund C, Olsen CM, Skogtvedt S, Tveit H, Prydz K, & Tranulis MA (2009) Alternative translation initiation generates cytoplasmic sheep prion protein. *J Biol Chem* 284: 19668-19678

Lund E & Dahlberg JE (2006) Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 59-66

Ma J & Lindquist S (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science* 298: 1785-1788

Ma J & Lindquist S (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: 14955-14960

Ma J, Wollmann R, & Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298: 1781-5

Ma JB, Ye K, & Patel DJ (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429: 318-322

Macedo B, Millen TA, Braga CA, Gomes MP, Ferreira PS, Kraineva J, Winter R, Silva JL, & Cordeiro Y (2012) Nonspecific prion protein-nucleic acid interactions lead to different aggregates and cytotoxic species. *Biochemistry* 51: 5402-5413

MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, & Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 512-517

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, & Prado MA (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277: 33311-33318

Magzoub M, Sandgren S, Lundberg P, Oglecka K, Lilja J, Wittrup A, Goran Eriksson LE, Langel U, Belting M, & Graslund A (2006) N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 379-385

Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, & Collinge J (2001) Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* 268: 105-114

- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, & Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871-874
- Malolepsza E, Boniecki M, Kolinski A, & Piela L (2005) Theoretical model of prion propagation: a misfolded protein induces misfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7835-7840
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, & Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8: 121-127
- Marella M, Gaggioli C, Batoz M, Deckert M, Tartare-Deckert S, & Chabry J (2005) Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J Biol Chem* 280: 1529-1534
- Marti E, Pantano L, Banez-Coronel M, Llorens F, Minones-Moyano E, Porta S, Sumoy L, Ferrer I, & Estivill X (2010) A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res* 38: 7219-7235
- Massignan T, Biasini E, Lauranzano E, Veglianese P, Pignataro M, Fioriti L, Harris DA, Salmona M, Chiesa R, & Bonetto V (2010) Mutant prion protein expression is associated with an alteration of the Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDI)/Rab11 pathway. *Mol Cell Proteomics* 9: 611-622
- Massignan T, Stewart RS, Biasini E, Solomon IH, Bonetto V, Chiesa R, & Harris DA A novel, drug-based, cellular assay for the activity of neurotoxic mutants of the prion protein. *J Biol Chem* 285: 7752-65
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, & Zamore PD (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123: 607-620
- Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Oie M, & Fujii M (2013) Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells* 18: 135-146
- Mattei S, Klein G, Satre M, & Aubry L (2006) Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *Eur J Cell Biol* 85: 925-936
- Maziere P & Enright AJ (2007) Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today* 12: 452-458

- Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, & Khandjian EW (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* 11: 3007-3017
- Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, Gallouzi I, & Pelletier J (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell* 17: 4212-4219
- McCullough J, Fisher RD, Whitby FG, Sundquist WI, & Hill CP (2008) ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7687-7691
- McHattie SJ, Brown DR, & Bird MM (1999) Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106-126 in vitro. *J Neurocytol* 28: 149-159
- McKnight S & Tjian R (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46: 795-805
- Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, Beck JA, Poulter M, Campbell T, Uphill JB, Goldstein D, Alpers M, Fisher EM, & Collinge J (2003) Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 300: 640-643
- Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, & Cortelli P (1992) Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 326: 444-449
- Medrano AZ, Barmada SJ, Biasini E, & Harris DA (2008) GFP-tagged mutant prion protein forms intra-axonal aggregates in transgenic mice. *Neurobiol Dis* 31: 20-32
- Mehrpour M & Codogno P (2010) Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett* 290: 1-23
- Miesbauer M, Rambold AS, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2010) Targeting of the prion protein to the cytosol: mechanisms and consequences. *Curr Issues Mol Biol* 12: 109-118
- Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, & Marti E (2011) MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 20: 3067-3078
- Miranda A, Pericuesta E, Ramirez MA, & Gutierrez-Adan A (2011a) Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PLoS One* 6: e18422

Miranda A, Pericuesta E, Ramirez MA, & Gutierrez-Adan A (2011b) Prion protein in ESC regulation. *Prion* 5: 169-171

Mishra RS, Bose S, Gu Y, Li R, & Singh N (2003) Aggresome formation by mutant prion proteins: the unfolding role of proteasomes in familial prion disorders. *J Alzheimers Dis* 5: 15-23

Misiewicz M, Dery MA, Foveau B, Jodoin J, Ruths D, & Leblanc AC (2013) Identification of a novel Endoplasmic Reticulum Stress Response Element regulated by XBP1. *J Biol Chem*

Mitteregger G, Korte S, Shakarami M, Herms J, & Kretzschmar HA (2009) Role of copper and manganese in prion disease progression. *Brain Res* 1292: 155-164

Miura T, Sasaki S, Toyama A, & Takeuchi H (2005) Copper reduction by the octapeptide repeat region of prion protein: pH dependence and implications in cellular copper uptake. *Biochemistry* 44: 8712-8720

Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, Arya P, Kaufman RJ, Pelletier J, & Mazroui R (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell* 20: 2673-2683

Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, & Baulcombe DC (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447: 1126-1129

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE et al (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

Morel M, Couturier J, Lafay-Chebassier C, Paccalin M, & Page G (2009) PKR, the double stranded RNA-dependent protein kinase as a critical target in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 13: 1476-1488

Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, & Mallucci GR (2012) Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485: 507-511

Moser JJ & Fritzler MJ (2013) Relationship of other cytoplasmic ribonucleoprotein bodies (cRNPB) to GW/P bodies. *Adv Exp Med Biol* 768: 213-242

- Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Lapalus P, Gray F, Laplanche JL, Hugon J, & Groupe d'Investigation du Liquide Céphalorachidien Study Network (2012) Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 71: 829-835
- Muller DW & Bosserhoff AK (2008) Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene* 27: 6698-706
- Munk C, Lohler J, Prassolov V, Just U, Stockschlader M, & Stocking C (1997) Amphotropic murine leukemia viruses induce spongiform encephalomyelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5837-5842
- Murchison EP & Hannon GJ (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 16: 223-229
- Nakai A & Ishikawa T (2000) A nuclear localization signal is essential for stress-induced dimer-to-trimer transition of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 275: 34665-34671
- Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, & Sorgato MC (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: 521-538
- Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoke R, Atarashi R, Houtani T, Torchia M, Sakaguchi S, DeArmond SJ, Prusiner SB, & Katamine S (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* 79: 689-697
- Nixon RR (2005) Prion-associated increases in Src-family kinases. *J Biol Chem* 280: 2455-2462
- Noland CL & Doudna JA (2013) Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA* 19: 639-648
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, & Krobitsch S (2007) Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 18: 1385-1396
- Norstrom EM, Ciaccio MF, Rassbach B, Wollmann R, & Mastrianni JA (2007) Cytosolic prion protein toxicity is independent of cellular prion protein expression and prion propagation. *J Virol* 81: 2831-2837



Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, & Baskakov IV (2006) Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem* 281: 13828-13836

Nunziante M, Ackermann K, Dietrich K, Wolf H, Gadtke L, Gilch S, Vorberg I, Groschup M, & Schätzl HM (2011) Proteasomal dysfunction and endoplasmic reticulum stress enhance trafficking of prion protein aggregates through the secretory pathway and increase accumulation of pathologic prion protein. *J Biol Chem* 286: 33942-33953

Nunziante M, Gilch S, & Schätzl HM (2003) Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J Biol Chem* 278: 3726-3734

Nykjaer A & Willnow TE (2002) The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 12: 273-280

O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Eimer WA, Hitt B, Bembinster LA, Lammich S, Lichtenthaler SF, Hebert SS, De Strooper B, Haass C, Bennett DA, & Vassar R (2008) Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 60: 988-1009

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, & Lai EC (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130: 89-100

Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Baba T, Tohyama M, & Taira K (2004) An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J* 23: 959-968

Orban TI & Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11: 459-469

Orom UA, Nielsen FC, & Lund AH (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30: 460-471

Orsi A, Fioriti L, Chiesa R, & Sitia R (2006) Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem* 281: 30431-30438

Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Baker HF, Ridley RM, Hsiao K, & Prusiner SB (1989) Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1: 51-52

Ozpolat B, Akar U, Tekedereli I, Alpay SN, Barria M, Gezgen B, Zhang N, Coombes K, Kornblau S, & Lopez-Berestein G (2012) PKC $\zeta$  Regulates Translation Initiation through PKR and eIF2 $\gamma$  in Response to Retinoic Acid in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Leuk Res Treatment* 2012: 10.1155/2012/482905

Padovani A, D'Alessandro M, Parchi P, Cortelli P, Anzola GP, Montagna P, Vignolo LA, Petraroli R, Pocchiari M, Lugaresi E, & Gambetti P (1998) Fatal familial insomnia in a new Italian kindred. *Neurology* 51: 1491-1494

Pal A, Severin F, Lommer B, Shevchenko A, & Zerial M (2006) Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172: 605-618

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, & Collinge J (1991) Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352: 340-342

Pamplona R, Naudi A, Gavin R, Pastrana MA, Sajani G, Ilieva EV, Del Rio JA, Portero-Otin M, Ferrer I, & Requena JR (2008) Increased oxidation, glycooxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. *Free Radic Biol Med* 45: 1159-1166

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, & Cohen FE (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: 10962-10966

Panigaj M, Glier H, Wildova M, & Holada K (2011) Expression of prion protein in mouse erythroid progenitors and differentiating murine erythroleukemia cells. *PLoS One* 6: e24599

Paquet C, Bose A, Polivka M, Peoc'h K, Brouland JP, Keohane C, Hugon J, & Gray F (2009) Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 190-198

Paquet C, Mouton-Liger F, Meurs EF, Mazot P, Bouras C, Pradier L, Gray F, & Hugon J (2012) The PKR activator PACT is induced by Aβeta: involvement in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 22: 219-229

Parker R & Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-646

Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Crouch PJ, Kanninen KM, & White AR (2012) Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates. *Neurochem Int* 60: 415-424

Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootosamy RC, Sunyach C, Jacobsen C, Oxvig C, Moestrup S, Liu Q, Bu G, Jen A, & Morris RJ (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci* 121: 773-783

Paroo Z, Ye X, Chen S, & Liu Q (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139: 112-122

- Patel RC & Sen GC (1998a) PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J* 17: 4379-4390
- Patel RC & Sen GC (1998b) Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol Cell Biol* 18: 7009-7019
- Pauly PC & Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273: 33107-33110
- Peel AL (2004) PKR activation in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 97-105
- Peel AL & Bredesen DE (2003) Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14: 52-62
- Pelchen-Matthews A, Raposo G, & Marsh M (2004) Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 12: 310-316
- Pelham HR (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 30: 517-528
- Perera WS & Hooper NM (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* 11: 519-523
- Perez AP, Cosaka ML, Romero EL, & Morilla MJ (2011) Uptake and intracellular traffic of siRNA dendriplexes in glioblastoma cells and macrophages. *Int J Nanomedicine* 6: 2715-2728
- Peters GA, Dickerman B, & Sen GC (2009) Biochemical analysis of PKR activation by PACT. *Biochemistry* 48: 7441-7447
- Petersen RB, Siedlak SL, Lee HG, Kim YS, Nunomura A, Tagliavini F, Ghetti B, Cras P, Moreira PI, Castellani RJ, Guentchev M, Budka H, Ironside JW, Gambetti P, Smith MA, & Perry G (2005) Redox metals and oxidative abnormalities in human prion diseases. *Acta Neuropathol* 110: 232-238
- Pfeiffer NV, Dirndorfer D, Lang S, Resenberger UK, Restelli LM, Hemion C, Miesbauer M, Frank S, Neutzner A, Zimmermann R, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2013) Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *EMBO J* 32: 1036-1051

- Piccardo P, Ghetti B, Dickson DW, Vinters HV, Giaccone G, Bugiani O, Tagliavini F, Young K, Dlouhy SR, & Seiler C (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
- Pietri M, Caprini A, Mouillet-Richard S, Pradines E, Ermonval M, Grassi J, Kellermann O, & Schneider B (2006) Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J Biol Chem* 281: 28470-28479
- Pillai RS, Artus CG, & Filipowicz W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10: 1518-1525
- Polano M, Bek A, Benetti F, Lazzarino M, & Legname G (2009) Structural insights into alternate aggregated prion protein forms. *J Mol Biol* 393: 1033-1042
- Polyakova O, Dear D, Stern I, Martin S, Hirst E, Bawumia S, Nash A, Dodson G, Bronstein I, & Bayley PM (2009) Proteolysis of prion protein by cathepsin S generates a soluble beta-structured intermediate oligomeric form, with potential implications for neurotoxic mechanisms. *Eur Biophys J* 38: 209-218
- Polymenidou M & Cleveland DW (2012) Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *J Exp Med* 209: 889-893
- Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D, & Raposo G (2005) Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis* 35: 143-148
- Pradines E, Loubet D, Schneider B, Launay JM, Kellermann O, & Mouillet-Richard S (2008) CREB-dependent gene regulation by prion protein: impact on MMP-9 and beta-dystroglycan. *Cell Signal* 20: 2050-2058
- Pratt AJ & MacRae IJ (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 284: 17897-17901
- Preall JB & Sontheimer EJ (2005) RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 123: 543-545
- Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, Laine J, Necchi D, Diwakar S, Schiffmann SN, Axelrad H, & D'Angelo E (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: 7091-7103
- Price NT & Proud CG (1990) Phosphorylation of protein synthesis initiation factor-2. Identification of the site in the alpha-subunit phosphorylated in reticulocyte lysates. *Biochim Biophys Acta* 1054: 83-88

Priola SA & Chesebro B (1998) Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *J Biol Chem* 273: 11980-11985

Provost P (2010) MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer's and prion diseases. *Brain Res* 1338: 58-66

Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13363-83

Prusiner SB (1989) Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol* 43: 345-374

Prusiner SB & Scott MR (1997) Genetics of prions. *Annu Rev Genet* 31: 139-175

Puckett C, Concannon P, Casey C, & Hood L (1991) Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49: 320-329

Pushie MJ, Pickering IJ, Martin GR, Tsutsui S, Jirik FR, & George GN (2011) Prion protein expression level alters regional copper, iron and zinc content in the mouse brain. *Metallomics* 3: 206-214

Qin K, Zhao L, Ash RD, McDonough WF, & Zhao RY (2009) ATM-mediated transcriptional elevation of prion in response to copper-induced oxidative stress. *J Biol Chem* 284: 4582-4593

Quaglio E, Restelli E, Garofoli A, Dossena S, De Luigi A, Tagliavacca L, Imperiale D, Migheli A, Salmona M, Sitia R, Forloni G, & Chiesa R (2011) Expression of mutant or cytosolic PrP in transgenic mice and cells is not associated with endoplasmic reticulum stress or proteasome dysfunction. *PLoS One* 6: e19339

Rachidi W, Mange A, Senator A, Guiraud P, Riondel J, Benboubetra M, Favier A, & Lehmann S (2003) Prion infection impairs copper binding of cultured cells. *J Biol Chem* 278: 14595-14598

Rambold AS, Miesbauer M, Rapaport D, Bartke T, Baier M, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2006) Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17: 3356-3368

Rambold AS, Muller V, Ron U, Ben-Tal N, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2008) Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *EMBO J* 27: 1974-1984

Rana TM (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 23-36

Rand TA, Petersen S, Du F, & Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123: 621-629

- Rane NS, Chakrabarti O, Feigenbaum L, & Hegde RS (2010) Signal sequence insufficiency contributes to neurodegeneration caused by transmembrane prion protein. *J Cell Biol* 188: 515-526
- Rane NS, Kang SW, Chakrabarti O, Feigenbaum L, & Hegde RS (2008) Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell* 15: 359-370
- Redecke L, von Bergen M, Clos J, Konarev PV, Svergun DI, Fittschen UE, Broekaert JA, Bruns O, Georgieva D, Mandelkow E, Genov N, & Betzel C (2007) Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro. *J Struct Biol* 157: 308-320
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, & Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11: 1640-1647
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, & Tatzelt J (2011) The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J* 30: 2057-2070
- Rezaei H, Eghiaian F, Perez J, Doublet B, Choiset Y, Haertle T, & Grosclaude J (2005) Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J Mol Biol* 347: 665-679
- Richards P, Didszun C, Campesan S, Simpson A, Horley B, Young KW, Glynn P, Cain K, Kyriacou CP, Giorgini F, & Nicotera P Dendritic spine loss and neurodegeneration is rescued by Rab11 in models of Huntington's disease. *Cell Death Differ* 18: 191-200
- Richardson EP, Jr & Masters CL (1995) The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrP<sup>C</sup> in the nervous system. *Brain Pathol* 5: 33-41
- Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, & Silverman WP (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: 758-765
- Robakis NK, Sawh PR, Wolfe GC, Rubenstein R, Carp RI, & Innis MA (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 U S A* 83: 6377-6381

Roberts TK, Eugenin EA, Morgello S, Clements JE, Zink MC, & Berman JW (2010) PrPC, the cellular isoform of the human prion protein, is a novel biomarker of HIV-associated neurocognitive impairment and mediates neuroinflammation. *Am J Pathol* 177: 1848-1860

Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, & McNicol A (2006) Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 107: 3907-3911

Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, Izquierdo I, Martins VR, & Brentani RR (1999) Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* 71: 349-353

Roffe M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, Gilch S, Vorberg I, Castilho BA, Martins VR, & Hajj GN (2010) Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13147-13152

Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, & LeBlanc A (2005) Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ* 12: 783-795

Rubenstein R, Gray PC, Cleland TJ, Piltch MS, Hlavacek WS, Roberts RM, Ambrosiano J, & Kim JI (2007) Dynamics of the nucleated polymerization model of prion replication. *Biophys Chem* 125: 360-367

Ruby JG, Jan CH, & Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448: 83-86

Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, & Dwek RA (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13044-13049

Rushworth JV, Griffiths HH, Watt NT, & Hooper NM (2013) Prion protein-mediated toxicity of amyloid-beta oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *J Biol Chem* 288: 8935-8951

Rutishauser D, Mertz KD, Moos R, Brunner E, Rulicke T, Calella AM, & Aguzzi A (2009) The comprehensive native interactome of a fully functional tagged prion protein. *PLoS One* 4: e4446

Ruvolo PP, Gao F, Blalock WL, Deng X, & May WS (2001) Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX. *J Biol Chem* 276: 11754-11758

Rymer DL & Good TA (2000) The role of prion peptide structure and aggregation in toxicity and membrane binding. *J Neurochem* 75: 2536-2545

- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, & Greene LA (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22: 10690-10698
- Rzeczkowski K, Beuerlein K, Muller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Kettner-Buhrow D, Holtmann H, & Kracht M (2011) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J Cell Biol* 194: 581-596
- Saba R, Goodman CD, Huzarewich RL, Robertson C, & Booth SA (2008) A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS One* 3: e3652
- Saito S (1990) Enhancement of the interferon-induced double-stranded RNA-dependent protein kinase activity by Sindbis virus infection and heat-shock stress. *Microbiol Immunol* 34: 859-870
- Saksena S, Sun J, Chu T, & Emr SD (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem Sci* 32: 561-573
- Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, & Ojala J (2009) ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation* 6: 41-2094-6-41
- Sancenon V, Lee SA, Patrick C, Griffith J, Paulino A, Outeiro TF, Reggiori F, Masliah E, & Muchowski PJ (2012) Suppression of alpha-synuclein toxicity and vesicle trafficking defects by phosphorylation at S129 in yeast depends on genetic context. *Hum Mol Genet* 21: 2432-2449
- Sanghera N, Wall M, Venien-Bryan C, & Pinheiro TJ (2008) Globular and pre-fibrillar prion aggregates are toxic to neuronal cells and perturb their electrophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1784: 873-881
- Santos TG, Silva IR, Costa-Silva B, Lepique AP, Martins VR, & Lopes MH (2011) Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* 29: 1126-1136
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, & Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169: 341-354
- Savas JN, Makusky A, Ottosen S, Baillat D, Then F, Krainc D, Shiekhattar R, Markey SP, & Tanese N (2008) Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10820-10825



- Schmalzbauer R, Eigenbrod S, Winoto-Morbach S, Xiang W, Schutze S, Bertsch U, & Kretzschmar HA (2008) Evidence for an association of prion protein and sphingolipid-mediated signaling. *J Neurochem* 106: 1459-1470
- Schneider B, Pietri M, Pradines E, Loubet D, Launay JM, Kellermann O, & Mouillet-Richard S (2011) Understanding the neurospecificity of Prion protein signaling. *Front Biosci* 16: 169-186
- Sen GL & Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-636
- Seo JS, Seol JW, Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, & Park SY (2010) Hypoxia protects neuronal cells from human prion protein fragment-induced apoptosis. *J Neurochem* 112: 715-722
- Sette P, Jadwin JA, Dussupt V, Bello NF, & Bouamr F (2010) The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL domain motif. *J Virol* 84: 8181-8192
- Sheth U & Parker R (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125: 1095-1109
- Sheth U & Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-808
- Shi Q & Dong XP (2011) (Ctm)PrP and ER stress: a neurotoxic mechanism of some special PrP mutants. *Prion* 5: 123-125
- Shiraishi N, Inai Y, & Ihara Y (2009) Proteinase K-resistant aggregates of recombinant prion protein PrP-(23-98) are toxic to cultured cells. *Protein Pept Lett* 16: 91-96
- Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Chen CJ, Hsu YD, & Chiang YH (2002) Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol Neurobiol* 26: 1-12
- Shyu WC, Kao MC, Chou WY, Hsu YD, & Soong BW (2000) Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport* 11: 771-774
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, & Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* 437: 257-261
- Silver JT & Noble EG (2012) Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones* 17: 1-9

- Simon D, Herva ME, Benitez MJ, Garrido JJ, Rojo AI, Cuadrado A, Torres JM, & Wandosell F (2013) Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and in vivo models of prion disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*
- Singh A, Haldar S, Horback K, Tom C, Zhou L, Meyerson H, & Singh N (2013) Prion protein regulates iron transport by functioning as a ferrireductase. *J Alzheimers Dis* 35: 541-552
- Singh A, Isaac AO, Luo X, Mohan ML, Cohen ML, Chen F, Kong Q, Bartz J, & Singh N (2009a) Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders. *PLoS Pathog* 5: e1000336
- Singh A, Kong Q, Luo X, Petersen RB, Meyerson H, & Singh N (2009b) Prion protein (PrP) knock-out mice show altered iron metabolism: a functional role for PrP in iron uptake and transport. *PLoS One* 4: e6115
- Singh A, Mohan ML, Isaac AO, Luo X, Petrak J, Vyoral D, & Singh N (2009c) Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. *PLoS One* 4: e4468
- Singh A, Qing L, Kong Q, & Singh N (2012) Change in the characteristics of ferritin induces iron imbalance in prion disease affected brains. *Neurobiol Dis* 45: 930-938
- Singh M, Castillo D, Patel CV, & Patel RC (2011) Stress-induced phosphorylation of PACT reduces its interaction with TRBP and leads to PKR activation. *Biochemistry* 50: 4550-4560
- Singh M, Fowlkes V, Handy I, Patel CV, & Patel RC (2009) Essential role of PACT-mediated PKR activation in tunicamycin-induced apoptosis. *J Mol Biol* 385: 457-468
- Singh M & Patel RC (2012) Increased interaction between PACT molecules in response to stress signals is required for PKR activation. *J Cell Biochem* 113: 2754-2764
- Singh N, Das D, Singh A, & Mohan ML (2010) Prion protein and metal interaction: physiological and pathological implications. *Curr Issues Mol Biol* 12: 99-107
- Singh N, Gu Y, Bose S, Kalepu S, Mishra RS, & Verghese S (2002) Prion peptide 106-126 as a model for prion replication and neurotoxicity. *Front Biosci* 7: a60-71
- Sloan M, Alegre-Abarrategui J, & Wade-Martins R (2012) Insights into LRRK2 function and dysfunction from transgenic and knockout rodent models. *Biochem Soc Trans* 40: 1080-5
- Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM, & Ross CA (2005) Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet* 14: 3801-3811

Solomon IH, Biasini E, & Harris DA (2012) Ion channels induced by the prion protein: mediators of neurotoxicity. *Prion* 6: 40-45

Solomon IH, Khatri N, Biasini E, Massignan T, Huettner JE, & Harris DA An N-terminal polybasic domain and cell surface localization are required for mutant prion protein toxicity. *J Biol Chem* 286: 14724-36

Solomon IH, Schepker JA, & Harris DA (2010) Prion neurotoxicity: insights from prion protein mutants. *Curr Issues Mol Biol* 12: 51-61

Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, & Joshua-Tor L (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10: 1026-1032

Soper JH, Kehm V, Burd CG, Bankaitis VA, & Lee VM (2011) Aggregation of alpha-synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *J Mol Neurosci* 43: 391-405

Soto C (2008) Endoplasmic reticulum stress, PrP trafficking, and neurodegeneration. *Dev Cell* 15: 339-41

Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, & Mohandas T (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7358-7362

Stahl A & Mueller BM (1995) The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J Cell Biol* 129: 335-344

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, & Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240

Stalder L, Heusermann W, Sokol L, Trojer D, Wirz J, Hean J, Fritzsche A, Aeschmann F, Pfanzagl V, Basselet P, Weiler J, Hintersteiner M, Morrissey DV, & Meisner-Kober NC (2013) The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *EMBO J* 32: 1115-1127

Starega-Roslan J, Koscianska E, Kozlowski P, & Krzyzosiak WJ (2011) The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell Mol Life Sci* 68: 2859-2871

Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, & Macklis JD (2006) Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3416-3421

Stengel A, Bach C, Vorberg I, Frank O, Gilch S, Lutzny G, Seifarth W, Erfle V, Maas E, Schatzl H, Leib-Mosch C, & Greenwood AD (2006a) Prion infection influences murine endogenous retrovirus expression in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 825-831

Stengel A, Bach C, Vorberg I, Frank O, Gilch S, Lutzny G, Seifarth W, Erfle V, Maas E, Schatzl H, Leib-Mosch C, & Greenwood AD (2006b) Prion infection influences murine endogenous retrovirus expression in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 825-831

Stewart RS, Drisaldi B, & Harris DA (2001) A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* 12: 881-889

Stewart RS & Harris DA (2005) A transmembrane form of the prion protein is localized in the Golgi apparatus of neurons. *J Biol Chem* 280: 15855-15864

Stewart RS & Harris DA (2003) Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *J Biol Chem* 278: 45960-45968

Stewart RS, Piccardo P, Ghetti B, & Harris DA (2005) Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J Neurosci* 25: 3469-3477

Stimson E, Hope J, Chong A, & Burlingame AL (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: 4885-4895

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, & Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* 22: 3591-3601

Taheny MJ, Izkhakov N, Vostrov AA, & Quitschke WW (2009) Two adjacent nuclear factor-binding domains activate expression from the human PRNP promoter. *BMC Res Notes* 2: 178-0500-2-178

Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, & Fujii M (2013) Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol* 33: 815-829

Takahashi S, Sakurai K, Ebihara A, Kajiho H, Saito K, Kontani K, Nishina H, & Katada T (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res* 39: 3446-3457

- Takimoto K, Wakiyama M, & Yokoyama S (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *Rna* 15: 1078-89
- Tan LP, Seinen E, Duns G, de Jong D, Sibon OC, Poppema S, Kroesen BJ, Kok K, & van den Berg A (2009a) A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res* 37: e137
- Tan Y, Zhang B, Wu T, Skogerbo G, Zhu X, Guo X, He S, & Chen R (2009b) Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Mol Biol* 10: 12-2199-10-12
- Tanabe M & Nakai A (1999) Signalling pathways of heat shock response in higher eukaryotes. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 44: 2434-2441
- Tanzer A & Stadler PF (2004) Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 339: 327-335
- Taylor DR & Hooper NM (2007) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J* 402: 17-23
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, & Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 118: 5141-5153
- Thellung S, Corsaro A, Villa V, Simi A, Vella S, Pagano A, & Florio T Human PrP90-231-induced cell death is associated with intracellular accumulation of insoluble and protease-resistant macroaggregates and lysosomal dysfunction. *Cell Death Dis* 2: e138
- Thellung S, Florio T, Corsaro A, Arena S, Merlino M, Salmona M, Tagliavini F, Bugiani O, Forloni G, & Schettini G (2000) Intracellular mechanisms mediating the neuronal death and astrogliosis induced by the prion protein fragment 106-126. *Int J Dev Neurosci* 18: 481-492
- Thellung S, Villa V, Corsaro A, Pellistri F, Venezia V, Russo C, Aceto A, Robello M, & Florio T (2007) ERK1/2 and p38 MAP kinases control prion protein fragment 90-231-induced astrocyte proliferation and microglia activation. *Glia* 55: 1469-1485
- Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, & Boccaccio GL (2011) RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23: 324-334
- Thorne L & Terry LA (2008) In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol* 89: 3177-3184

- Tobler I, Deboer T, & Fischer M (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* 17: 1869-1879
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, & Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642
- Torres M, Castillo K, Armisen R, Stutzin A, Soto C, & Hetz C (2010) Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 5: e15658
- Torres M, Encina G, Soto C, & Hetz C Abnormal calcium homeostasis and protein folding stress at the ER: A common factor in familial and infectious prion disorders. *Commun Integr Biol* 4: 258-61
- Towle HC (2007) The metabolic sensor GCN2 branches out. *Cell Metab* 5: 85-87
- Tsai NP & Wei LN (2010) RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis. *Cell Signal* 22: 668-675
- Turnbull S, Tabner BJ, Brown DR, & Allsop D (2003) Copper-dependent generation of hydrogen peroxide from the toxic prion protein fragment PrP106-126. *Neurosci Lett* 336: 159-162
- Turola E, Furlan R, Bianco F, Matteoli M, & Verderio C (2012) Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. *Front Physiol* 3: 149
- Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, & Mori H (2011) Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 89: 1031-1042
- Unterholzner L & Izaurralde E (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 16: 587-596
- Urso E, Manno D, Serra A, Buccolieri A, Rizzello A, Danieli A, Acierno R, Salvato B, & Maffia M (2012) Role of the cellular prion protein in the neuron adaptation strategy to copper deficiency. *Cell Mol Neurobiol* 32: 989-1001
- Urso E, Rizzello A, Acierno R, Lionetto MG, Salvato B, Storelli C, & Maffia M (2010) Fluorimetric analysis of copper transport mechanisms in the b104 neuroblastoma cell model: a contribution from cellular prion protein to copper supplying. *J Membr Biol* 233: 13-21

- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, & Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20: 515-524
- Valenti P, Cozzio A, Nishida N, Wolfer DP, Sakaguchi S, & Lipp HP (2001) Similar target, different effects: late-onset ataxia and spatial learning in prion protein-deficient mouse lines. *Neurogenetics* 3: 173-184
- Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, Urwin H, Manser C, Miller CC, Hortobagyi T, Dragunow M, Rogelj B, & Shaw CE (2013) ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* 22: 2676-2688
- Vanderperre B, Staskevicius AB, Tremblay G, McCoy M, O'Neill MA, Cashman NR, & Roucou X (2011) An overlapping reading frame in the PRNP gene encodes a novel polypeptide distinct from the prion protein. *FASEB J* 25: 2373-2386
- Vanderweyde T, Yu H, Varnum M, Liu-Yesucevitz L, Citro A, Ikezu T, Duff K, & Wolozin B (2012) Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies. *J Neurosci* 32: 8270-8283
- Varela-Nallar L, Gonzalez A, & Inestrosa NC (2006a) Role of copper in prion diseases: deleterious or beneficial? *Curr Pharm Des* 12: 2587-2595
- Varela-Nallar L, Toledo EM, Larrondo LF, Cabral AL, Martins VR, & Inestrosa NC (2006b) Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C271-81
- Vasan S, Mong PY, & Grossman A (2006) Interaction of prion protein with small highly structured RNAs: detection and characterization of PrP-oligomers. *Neurochem Res* 31: 629-637
- Vassallo N, Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, Windl O, & Kretzschmar HA (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 75-82
- Vasudevan S & Steitz JA (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128: 1105-1118
- Vasudevan S, Tong Y, & Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934
- Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, & Hill AF (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211: 582-590

Verweij FJ, Middeldorp JM, & Pegtel DM (2012) Intracellular signaling controlled by the endosomal-exosomal pathway. *Commun Integr Biol* 5: 88-93

Vidal RL & Hetz C (2012) Crosstalk between the UPR and autophagy pathway contributes to handling cellular stress in neurodegenerative disease. *Autophagy* 8: 970-972

Vitte J, Traver S, Maues De Paula A, Lesage S, Rovelli G, Corti O, Duyckaerts C, & Brice A (2010) Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 959-972

Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, & Conrad R (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820: 940-948

Wadsworth JD & Collinge J (2007) Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 598-609

Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, & Collinge J (2003) Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 66: 241-254

Walsh P, Neudecker P, & Sharpe S (2010) Structural properties and dynamic behavior of nonfibrillar oligomers formed by PrP(106-126). *J Am Chem Soc* 132: 7684-7695

Walsh P, Simonetti K, & Sharpe S (2009) Core structure of amyloid fibrils formed by residues 106-126 of the human prion protein. *Structure* 17: 417-426

Wang JH, Du JP, Li SJ, Zhai LP, Yang XY, Wang ZH, Wu ZT, & Han Y (2012) Octarepeat peptides of prion are essential for multidrug resistance in gastric cancer cells. *J Dig Dis* 13: 143-152

Wang JH, Du JP, Zhang YH, Zhao XJ, Fan RY, Wang ZH, Wu ZT, & Han Y (2011) Dynamic changes and surveillance function of prion protein expression in gastric cancer drug resistance. *World J Gastroenterol* 17: 3986-3993

Wang Q, Qian J, Wang F, & Ma Z (2012a) Cellular prion protein accelerates colorectal cancer metastasis via the Fyn-SP1-SATB1 axis. *Oncol Rep* 28: 2029-2034

Wang SB, Shi Q, Xu Y, Xie WL, Zhang J, Tian C, Guo Y, Wang K, Zhang BY, Chen C, Gao C, & Dong XP (2012b) Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PLoS One* 7: e38221



- Wang X, Dong CF, Shi Q, Shi S, Wang GR, Lei YJ, Xu K, An R, Chen JM, Jiang HY, Tian C, Gao C, Zhao YJ, Han J, & Dong XP (2009) Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB Rep* 42: 444-449
- Wang X, Shi Q, Xu K, Gao C, Chen C, Li XL, Wang GR, Tian C, Han J, & Dong XP (2011) Familial CJD associated PrP mutants within transmembrane region induced Ctm-PrP retention in ER and triggered apoptosis by ER stress in SH-SY5Y cells. *PLoS One* 6: e14602
- Wang X, Wang F, Arterburn L, Wollmann R, & Ma J (2006) The interaction between cytoplasmic prion protein and the hydrophobic lipid core of membrane correlates with neurotoxicity. *J Biol Chem* 281: 13559-13565
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, & Sasaki H (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453: 539-543
- Watt NT & Hooper NM (2003) The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* 28: 406-410
- Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, & Hooper NM (2012) Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun* 3: 1134
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, & Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37: 1296-1300
- Weissmann C, Fischer M, Raeber A, Bueler H, Sailer A, Shmerling D, Rulicke T, Brandner S, & Aguzzi A (1998) The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech* 17: 278-290
- Weissmann C & Flechsig E (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66: 43-60
- Wek RC, Jiang HY, & Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34: 7-11
- Westergard L, Christensen HM, & Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 629-644
- Westergard L, Turnbaugh JA, & Harris DA A nine amino acid domain is essential for mutant prion protein toxicity. *J Neurosci* 31: 14005-17

- Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, & Weil D (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* 118: 981-992
- Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, & Collinge J (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: 259-264
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, Oberdieck C, Bodemer M, Poser S, & Kretzschmar HA (1999) Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 105: 244-252
- Wong BS, Brown DR, Pan T, Whiteman M, Liu T, Bu X, Li R, Gambetti P, Olesik J, Rubenstein R, & Sy MS (2001) Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *J Neurochem* 79: 689-698
- Woodman PG & Futter CE (2008) Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol* 20: 408-414
- Wu D, Zhang W, Luo Q, Luo K, Huang L, Wang W, Huang T, Chen R, Lin Y, Pang D, & Xiao G (2010) Copper (II) promotes the formation of soluble neurotoxic PrP oligomers in acidic environment. *J Cell Biochem* 111: 627-633
- Wu L & Gonias SL (2005) The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem* 96: 1021-1033
- Wu S & Kaufman RJ (1997) A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J Biol Chem* 272: 1291-1296
- Xu K, Wang X, Shi Q, Chen C, Tian C, Li XL, Zhou RM, Chu YL, & Dong XP (2011) Human prion protein mutants with deleted and inserted octarepeats undergo different pathways to trigger cell apoptosis. *J Mol Neurosci* 43: 225-234
- Xu Y, Tian C, Wang SB, Xie WL, Guo Y, Zhang J, Shi Q, Chen C, & Dong XP (2012) Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy* 8: 1604-1620
- Yamasaki T, Suzuki A, Shimizu T, Watarai M, Hasebe R, & Horiuchi M (2012) Characterization of intracellular localization of PrP(Sc) in prion-infected cells using a mAb that recognizes the region consisting of aa 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol* 93: 668-680

- Yang AJ, Chandswangbhuvana D, Margol L, & Glabe CG (1998) Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis. *J Neurosci Res* 52: 691-698
- Yang X, Yang L, Zhou X, Khan SH, Wang H, Yin X, Yuan Z, Song Z, Wu W, & Zhao D (2013) Using Protein Misfolding Cyclic Amplification Generates a Highly Neurotoxic PrP Dimer Causing Neurodegeneration. *J Mol Neurosci*
- Yao B, Li S, Jung HM, Lian SL, Abadal GX, Han F, Fritzler MJ, & Chan EK Divergent GW182 functional domains in the regulation of translational silencing. *Nucleic Acids Res* 39: 2534-47
- Yap YH & Say YH (2012) Resistance against tumour necrosis factor alpha apoptosis by the cellular prion protein is cell-specific for oral, colon and kidney cancer cell lines. *Cell Biol Int* 36: 273-277
- Ye X, Huang N, Liu Y, Paroo Z, Huerta C, Li P, Chen S, Liu Q, & Zhang H (2011) Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat Struct Mol Biol* 18: 650-657
- Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, & Kim VN (2006) Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 34: 4622-4629
- Yi R, Doehle BP, Qin Y, Macara IG, & Cullen BR (2005) Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* 11: 220-226
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, & Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276: 13935-13940
- Yoon JH, Choi EJ, & Parker R (2010) Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 189: 813-827
- Yu G, Jiang L, Xu Y, Guo H, Liu H, Zhang Y, Yang H, Yuan C, & Ma J (2012) Silencing prion protein in MDA-MB-435 breast cancer cells leads to pleiotropic cellular responses to cytotoxic stimuli. *PLoS One* 7: e48146
- Yuyama K & Yanagisawa K (2009) Late endocytic dysfunction as a putative cause of amyloid fibril formation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 109: 1250-60

- Zafar S, von Ahsen N, Oellerich M, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Armstrong VW, & Asif AR (2011) Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *J Proteome Res* 10: 3123-3135
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, & Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 145-150
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, & Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21: 3307-3316
- Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, & Lodish HF (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 H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, & Filipowicz W (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 21: 5875-5885
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, & Filipowicz W (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118: 57-68
- Zhou X, Ruan J, Wang G, & Zhang W (2007) Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 3: e37
- Zhuang D, Liu Y, Mao Y, Gao L, Zhang H, Luan S, Huang F, & Li Q (2012) TMZ-induced PrPc/par-4 interaction promotes the survival of human glioma cells. *Int J Cancer* 130: 309-318
- Zivny JH, Gelderman MP, Xu F, Piper J, Holada K, Simak J, & Vostal JG (2008) Reduced erythroid cell and erythropoietin production in response to acute anemia in prion protein-deficient (Prnp<sup>-/-</sup>) mice. *Blood Cells Mol Dis* 40: 302-307
- Zou T, Rao JN, Liu L, Xiao L, Cui YH, Jiang Z, Ouyang M, Donahue JM, & Wang JY (2012) Polyamines inhibit the assembly of stress granules in normal intestinal epithelial cells regulating apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C102-11
- Zou T, Yang X, Pan D, Huang J, Sahin M, & Zhou J (2011) SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress. *Cell Mol Neurobiol* 31: 541-550

**ANNEXES**

**AUTORISATION D'INTÉGRATION  
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION  
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(e)s, co-auteur(s) de l'article intitulé : Prion protein  
familial mutants interfere with multivesicular bodies maturation  
and miRNA-related activity.

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire  de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Beaudoin, Simon

inscrit(e) au programme de Biochimie

de la Faculté de médecine et science de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires\*

Signature [Signature]

Date : 20-08-13

Nom JULIE MORARD

Coordonnées 28-2001, PRAC, Vds

Signature [Signature]

Date : 12/19-13

Nom Xavier Roucou

Coordonnées 28-2001, PRAC, Vds

Signature [Signature]

Date : 12/19/2013

Nom Guillaume Tremblay

Coordonnées 28-2001, PRAC, Vds

Signature \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Nom \_\_\_\_\_

Coordonnées \_\_\_\_\_

\* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

Beaudoin et al.

**PRION PROTEIN FAMILIAL MUTANTS INTERFERE WITH MULTIVESICULAR  
BODIES MATURATION AND miRNA-RELATED ACTIVITY**

**Simon Beaudoin<sup>1</sup>, Guillaume Tremblay<sup>1</sup>, Julie Motard<sup>1</sup>, Xavier Roucou<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault,  
Sherbrooke, J1E 4K8 Quebec, Canada

To whom correspondence should be addressed: Dr Xavier Roucou, Department of  
Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault,  
Sherbrooke, Québec J1E 4K8, Canada, Tel. (819) 821 8000x72240; Fax. (819) 820 6831;  
E-Mail: [xavier.roucou@usherbrooke.ca](mailto:xavier.roucou@usherbrooke.ca)

**Keywords:** Prion protein, miRNA, RNA-induced silencing complex, Prion diseases,  
Neurodegeneration, Multivesicular bodies

**Running title :** PrP MUTANTS ALTER MVB AND miRNA ACTIVITY.

## **ABSTRACT**

Recently, the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) was detected on multivesicular bodies (MVBs) and exosomes, secreted microvesicles derived from MVBs. One intriguing feature of MVBs-localized PrP<sup>C</sup> is its ability to bind essential components of microRNA (miRNA)-induced silencing complex (miRISC), including members of the Argonaute family (Ago), and to promote miRNA activity. Whether PrP<sup>C</sup> familial mutants associated to inherited forms of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are still able to promote miRNA activity is unknown. Here, we confirm that PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the miRISC components Ago2 and GW182 on MVBs, and stimulates miRNA activity. We also show that PrP<sup>C</sup> lacking the octapeptide repeat (OR) domain in the unstructured N-terminal region cannot interact with Ago2 or rescue miRNA activity in PrP<sup>C</sup> knockdown cells, which demonstrates the importance of PrP<sup>C</sup> OR domain for normal miRNA activity. Most importantly, we show that several PrP<sup>C</sup> familial mutants as well as an artificial cytoplasmic form of PrP<sup>C</sup> interfere with the maturation of MVBs and consequently alter lysosome morphology, exosomes processing, localization of GW182 (a RISC component) and miRNA activity. We suggest that these effects are a direct cause of decreased MVBs maturation, and may participate in neuronal degeneration in familial TSEs.



## INTRODUCTION

Prion diseases, or Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), are infectious and invariably fatal neurodegenerative disorders. TSEs are caused by a misfolded isoform of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) termed PrP<sup>Sc</sup> which is infectious and self-propagating (Prusiner, 1998). In human, they may present with sporadic (~85%), inherited (~15%), or acquired by infection (~less than 1%) manifestations, all of which involve modification of the cellular prion protein PrP<sup>C</sup> (Wadsworth & Collinge, 2007). The underlying neurotoxic mechanism of TSEs is still misunderstood, but increasing evidence point to a loss of or subversion of the normal function of PrP<sup>C</sup> (Watt et al., 2012; Jodoin et al., 2007; Singh et al., 2009). In this context, it is essential to elucidate the cellular pathways in which PrP<sup>C</sup> is involved.

There is a lot of evidence that the endolysosomal system is altered during TSEs pathogenesis and participates in prion conversion (Coleman et al., 2012; Kovacs et al., 2007; Ashok & Hegde, 2009; Marijanovic et al., 2009). Moreover, some familial mutants associated with inherited TSEs and an artificial cytoplasmic PrP mutant (CyPrP) inhibit the maturation of endolysosomes, including multivesicular bodies (MVBs), via an interaction with the mono-ubiquitin ligase Mahogunin (Aguzzi & Steele, 2009; Chakrabarti & Hegde, 2009) or by altering Rab activities (Gawinecka et al., 2012; Massignan et al., 2010; Zafar et al., 2011). Interestingly, there is a physical association between MVBs and Ago2 and GW182, two core components of the microRNA-induced silencing complex (miRISC) responsible for miRNA activity. MVBs regulate miRISC formation and turnover, and blocking the formation of MVBs partially impairs miRNA silencing (Gibbings & Voinnet, 2010; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009). GW182

Beaudoin et al.

interaction with Ago is mediated by GWG motifs (Chekulaeva et al., 2010; Takimoto et al., 2009). Strikingly, the octapeptide repeat (OR) region of PrP<sup>C</sup> contains four GWG motifs and PrP<sup>C</sup> colocalizes with Ago2 and GW182 in the MVBs and enhances miRNA activity by promoting accumulation of miRNA complexes (Gibbings et al., 2012). These observations prompted us to test if PrP<sup>C</sup> OR domain in a physiological context is essential for its activity on miRNA efficiency and if mutations associated with inherited forms of TSEs impair this novel function of PrP<sup>C</sup>.

Here, we confirm that PrP<sup>C</sup> interacts with GW182 and Ago2, and that PrP<sup>C</sup> is essential to maintain efficient miRNA activity. We demonstrate that the OR region of PrP<sup>C</sup> is crucial for the interactions between PrP<sup>C</sup>, Ago2 and for miRNA activity regulation. We selected five mutants of PrP<sup>C</sup> representing two phenotypes of inherited human prion diseases, familial Creutzfeldt-Jakob disease (E200K, D178N) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (P102L, Y145X, Q160X). We also used an artificial mutant that accumulates in the cytoplasm which has been proposed to mimic a toxic mechanism in TSEs (Mishra et al., 2003; Kristiansen et al., 2005; Goggin et al., 2008; Chakrabarti & Hegde, 2009). We show that PrP<sup>C</sup> mutants cause the delocalization of Alix and GW182 from MVBs. We traced the effect of MVBs maturation inhibition and observed altered lysosomes morphology, decreased secreted microvesicles such as exosome, and reduced miRNA activity in cells expressing PrP<sup>C</sup> mutants. We propose that deregulation of MVBs processing and miRNA activity by PrP<sup>C</sup> familial mutants may represent a pathogenic mechanism in inherited TSEs.

## RESULTS

### **The OR domain is crucial for PrP<sup>C</sup> interaction with miRISC on MVBs and for efficient promotion of miRISC activity**

PrP<sup>C</sup> is a protein with several interaction partners, including cytoplasmic RNA binding proteins (Spielhauer & Schatzl, 2001). Recently, a direct interaction was demonstrated between PrP<sup>C</sup> and Ago2 and GW182 proteins, two miRISC core components. This interaction occurred on MVBs of HeLa and N2a cells and is necessary to maintain miRNA activity (Gibbins et al., 2012). We thought that it was important to validate these results in our experiments. We confirmed by immunofluorescence the colocalization of endogenous PrP<sup>C</sup> with GW182 and Ago2 on MVB-like structures in the cytoplasm of N2a (Fig. 1A) and embryonic HEK293 cells (Fig. S1A). In agreement with these results, Ago2 and GW182 were co-immunoprecipitated with either a monoclonal antibody targeting PrP N-terminus (Fig. 1C), or a polyclonal antibody (Fig. 1D), but not with an antibody against PMP70 protein, an unrelated peroxisomal membrane protein (Fig. 1E). Importantly, PrP<sup>C</sup> was also co-immunoprecipitated reciprocally using anti-Ago2 and anti-GW182 antibodies (Fig. 1C). Similar results were obtained in HEK293 cells (Fig. S1C-E). PrP<sup>C</sup> also partially co-localized with three proteins present on MVBs and late endosomes, Alix (Figs 1B, S1B), CD63 and Rab7a (Fig. 1B). This result is consistent with previously reported colocalization and interaction between PrP<sup>C</sup> and Rab7a in neuronal cells (Zafar et al., 2011). Together, these results corroborate previous reports showing PrP<sup>C</sup> interaction with miRISC on MVB-like structures (Gibbins et al., 2012). Bio-informatics studies revealed that PrP<sup>C</sup> OR region has a predicted GWG motif (Karlowski et al., 2010; El-Shami et al., 2007), and glutathione S-transferase-tagged OR

domain associates with Ago2 in vitro (Gibbings et al., 2012). However, the implication of the OR in the whole PrP<sup>C</sup> protein context remained to be tested. Here, we show that in contrast to PrP<sup>GFP</sup>, PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> displayed no detectable interaction with Ago2 demonstrating that the OR domain is essential for this interaction (Fig. 1F).

Several proteins containing GWG motifs are known to regulate the miRNA pathway via interactions with AGO proteins (Castilla-Llorente et al., 2012; El-Shami et al., 2007; Eulalio et al., 2009), and PrP<sup>C</sup>-deficient cells display reduced miRNA activity (Gibbings et al., 2012). In order to further investigate the implication of PrP<sup>C</sup> and its OR region in miRNA activity, we carried out luciferase assays in cells transfected with a *Renilla* construct flanked with a 3'UTR with let-7a target sites, and normalized this activity with a construct devoid of let-7a target sites (Fig. 2A). In this experiment, HEK293 cells were expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup>, or were treated with a siRNA against PrP<sup>C</sup> and transfected with empty vector or with PrP<sup>C</sup> or PrP $\Delta$ OR (Fig. 2B). We demonstrate that the miRNA activity is significantly decreased in PrP<sup>C</sup> knockdown HEK293 and HeLa cells (Figs 2C, S2, S3), leading support to previously reported results showing that PrP<sup>C</sup> is not essential for but improves the efficacy of miRNA activity (Gibbings et al., 2012). We additionally observed that rescue of PrP<sup>C</sup> expression through transfection of wild-type PrP<sup>C</sup>, but not PrP $\Delta$ OR, restored the miRNA activity (Fig. 2C, S3). Western blot in Fig. 2D illustrates PrP<sup>C</sup> knockdown efficacy and rescue. These data were confirmed in HeLa cells (Fig. S3). Our results confirm the influence of PrP<sup>C</sup> on miRNA activity and establish the importance of the OR region for this regulation.

### **PrP<sup>C</sup> familial mutants and CyPrP, an artificial mutant, inhibit miRNA activity**

We then investigated if PrP<sup>C</sup> familial mutations could interfere with the ability of PrP<sup>C</sup> to promote miRNA activity (Fig. 3A). If mutations affect the ability of PrP<sup>C</sup> to promote miRNA-mediated repression, cells expressing familial mutants would be expected to display a miRNA activity similar to mock-transfected cells. Unexpectedly, we observed that all tested PrP<sup>C</sup> familial mutants significantly inhibit miRNA activity in HEK293 and HeLa cells as opposed to PrP<sup>C</sup> (Figs 3B, S4). Neither overexpression of PrP<sup>C</sup> nor PrP<sup>C</sup> mutants affect the levels of pre-let-7a or mature let-7a, suggesting that the observed reduction in silencing activity was not due to alterations in the miRNA maturation (Fig. 3C-D). CyPrP, an artificial mutant that accumulates in the cytosol of transfected cells, also significantly reduced miRNA activity without altering miRNA processing.

### **(VERSION JU)**

### **Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect the maturation of MVBs**

A key result consistent with the implication of MVBs in RNA silencing is the observation that knockdown of Alix, a key protein involved in MVBs maturation, results in alteration of MVBs and decreased RNA silencing (Gibbins et al., 2009). Since PrP<sup>C</sup> mutants inhibit miRNA activity, we tested for possible defects in MVBs assembly. First, MVBs were detected by immunofluorescence using antibodies against Alix. Cells expressing PrP<sup>C</sup> mutants had less, smaller or undetectable Alix-positive MVB-like organelles in their cytosol compared to PrP<sup>C</sup>-expressing cells (Fig. 4A). Quantification of Alix levels did not show any significant change in cells transfected with PrP mutants, indicating that Alix likely had relocated to non-MVBs compartments (Fig. 4B). Second, since GW182

associates with MVBs, we probed GW182 localization in cells expressing PrP<sup>C</sup> familial mutants by immunofluorescence. In cells expressing PrP<sup>C</sup>, we observed a typical distribution of GW182 in large MVBs (Fig. 4C). In contrast, GW182 staining did not reveal typical MVB-like organelles in cells expressing PrPC mutants (Fig. 4C). Similar to Alix, levels of GW182 did not change in cells expressing familial mutants (Fig. 4D), indicating that GW182 likely relocates to the cytosol. In contrast to familial mutants, CyPrP aggregates sequestered Alix and GW182 in the cytoplasm (Figs 4A, 4C). This sequestration likely explains how this mutant affects miRISC activity.

#### **PrPC familial mutants perturb MVBs derived vesicles biogenesis**

Mature MVBs sort component proteins to different destinations, such as lysosomes for protein degradation and exosomes when fusing with plasma membrane. Therefore, we assessed the impact of inadequate MVBs maturation caused by PrP<sup>C</sup> mutants on downstream vesicles processing. First, the effect of un mature MVBs is observed by immunofluorescence against Lamp-1 protein, a lysosomal marker. Cells expressing PrP<sup>C</sup> mutants display different lysosomes morphology as seen by reduced staining intensity in Lamp-1 foci (Fig. 5A). Intracellular levels of Lamp-1 levels did not significantly change between cells transfected with PrP mutants and wild-type PrP<sup>C</sup> (Fig. 5B), indicating that the observed effect is on organelle localization rather than protein production. In addition, MVBs are sites of exosome biogenesis and their inadequate maturation is known to affect microvesicles production (Hurley & Odorizzi, 2012; MacDonald et al., 2012). To assess the effect of PrP familial mutants on the exosomes as a consequence of MVBs deficient maturity, we purified secreted microvesicles from supernatants of cells expressing either

wild-type PrP<sup>C</sup> or familial mutants. We first visualized purified material by electron microscopy with or without immunogold labelling (Fig. S5A-C) and NanoSight tracking (Fig. S5D) and found a heterogeneous population of vesicles. Size distribution of the purified material is comparable between PrP<sup>C</sup> and PrP mutants preparations (data not shown). We then aimed at characterizing markers of exosomal particles either by ELISA of CD63 (Fig. 6A) or by western blots of Alix, CD63, Lamp-1 and  $\alpha$ -tubulin (Fig. 6B-C) on the purified preparation of secreted material. Although intracellular proteins level does not vary (Fig. 6D), we found by both methods that familial mutants expression induces a decrease of markers signal in secreted material. The Nanoparticle Tracking Analysis allowed us to look at subpopulation of secreted vesicles. We observed a significant decrease of vesicle quantity in the measurable size fraction representing exosomes (40-120 nm) (Fig. 6E), especially the smaller portion (40-80 nm) (Fig. S5E). Altogether, these results confirm that PrP mutants alter lysosomes and exosomes hallmarks, probably because of Alix delocalization, which is essential to form intraluminal vesicles in MVB such as exosomes (Baietti et al., 2012; Hurley & Odorizzi, 2012) and MVB/lysosomal sorting (Dores et al., 2012).

## DISCUSSION

Diverse functions were attributed to PrP<sup>C</sup> as a modulator of cell proliferation and differentiation, and many of those are tightly regulated by miRNA, in particular by let-7a (Bremer et al., 2010; Peralta et al., 2011; Stella et al., 2010; Zhang et al., 2007). Previous studies showed that PrP<sup>C</sup> interacts with many RNA-binding proteins implicated in diverse pathways of the mRNA decay (Zafar et al., 2011; Spielhauer & Schatzl, 2001; Satoh et al., 2009). Recently, PrP<sup>C</sup> was proposed to be a new positive regulator of miRNA activity by promoting the formation of mature miRISC (Ago-GW182-miRNA complex) probably via the GWG motif present in PrP<sup>C</sup> OR region (Gibbins et al., 2012). Here, we confirmed that PrP<sup>C</sup> interacts with Ago2 and GW182 on MVBs and increases miRNA activity. Moreover, we demonstrated that the OR domain is essential for these activities. Therefore, our results add to the hypothesis of PrP<sup>C</sup> being a novel representative of the GWG proteins family known to be crucial for maintaining high miRNA activity. Interestingly, several diseases are related to both PrP<sup>C</sup> and miRNA deregulation such as cancer (Antony et al., 2012; Jansson & Lund, 2012), Alzheimer's (Alier et al., 2011; Lukiw et al., 2012; Um et al., 2012) and prion diseases (Bellingham et al., 2012; Montag et al., 2012). It would be interesting to investigate if the known but yet misunderstood implication of PrP<sup>C</sup> and miRNA activity in these diseases and in the metastasis process involves the novel PrP<sup>C</sup>-mediated modulation of the miRNA pathway elucidated here.

TSEs were suggested to be linked with a deregulation of the endolysosomal system (ELS), such as accumulation and enlargement of early endosomes and alteration of



lysosomes biogenesis (Coleman et al., 2012; Kovacs et al., 2007; Ashok & Hegde, 2009) which is associated with the alteration of MVB maturation. Recently, two studies revealed a deregulation of some Rab proteins activity in TSEs (Gawinecka et al., 2012; Massignan et al., 2010; Zafar et al., 2011). These proteins are important for the maturation of ELS. Furthermore, CyPrP and some familial PrP<sup>C</sup> mutants inhibit Mahogunin, an ubiquitin ligase which is important for sorting proteins to MVBs, resulting in defects in the maturation of endosomes to MVBs (Aguzzi & Steele, 2009; Chakrabarti & Hegde, 2009). In a series of elegant studies, exosomes released from prion-infected neuronal cells were shown to have distinct features compared to non-infected cells. Exosomes, heterogeneous vesicles with 1, 2 or 3 membranes, with triple-membrane is reduced at the detriment of single-membrane exosomes from prion-infected cells (Coleman et al., 2012). Also, the miRNA signature in released exosomes was found to be distinct in prion-infected cells (Bellingham et al., 2012). These observations support the hypothesis that misfolded PrP<sup>C</sup> alters the MVBs-exosomal pathway, as shown by our study with pathological mutants. Interestingly, the maturation of the ELS is crucial to maintain a normal miRNA activity (Gibbings & Voinnet, 2010; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009), and regulation of miRISC is related to neuronal cells homeostasis because of its involvement in diverse processes, including neuronal development, plasticity, synaptic activity, cells survival and death (Shah et al., 2010; Goff et al., 2009). Here, we show that PrP<sup>C</sup> mutants affect miRNA activity, cause delocalization of Alix and GW182 from MVB-like organelles and modify lysosomes and exosomes downstream vesicles biogenesis. We propose that Alix and GW182 delocalization in non-MVB compartment depicts deficient MVB maturation which explains miRNA activity

Beaudoin et al.

inhibition, altered lysosomes morphology and exosomal vesicles modifications related to PrP<sup>C</sup> familial mutants expression. This mechanism may contribute to the neurodegeneration observed in familial TSEs. Several other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases are associated with defects in MVBs (Li et al., 2010; Umeda et al., 2011; Pal et al., 2006; Higashi et al., 2009) and miRNA pathway (Ghose et al., 2011; Lee et al., 2012; Minones-Moyano et al., 2011; Savas et al., 2008). It would be of great interest to determine if ELS maturation and miRNA activity are also affected in these disorders.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Antibodies**

Primary antibodies used for immunofluorescence were mouse monoclonal anti-PrP SAF32 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA, 189720; IF and WB: 1µg/ml; IP: 10µg/ml) and 3F4 (Millipore, Billerica, MA, USA, MAB1562; IF and WB: 1/1000; IP: 10µl) antibodies, rabbit polyconal anti-Ago2 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab32381; IF: 2.5µg/ml; WB: 2µg/ml; IP: 5µg/ml), anti-GW182 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab87541; IF and WB: 1/500; IP: 4µl), anti-Alix (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab76608; IF: 5µg/ml; WB: 1µg/ml; IGS:1/100), anti-CD63 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-15363; IF: 1/100; WB: 1/200; IGS: 1/100), anti-rab7a (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,USA, sc-10767; IF: 1/100), anti-Lamp-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, L1418; IF: 1/250, WB: 1/500), α-tubulin (Life Technologies, Burlington, ON, CA, A11126; WB: 1/500). Secondary antibodies were rabbit Alexa Fluor 633 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Burlington, ON, CA, A21072 (IF: 1/1000)) and mouse Alexa Fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Burlington, ON, CA, A11017 (IF: 1/1000)) for PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>C</sup> mutants detection. For western blot and immunoprecipitation analyses, antibody used were mouse monoclonal anti-β-actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, A5441; WB: 1/10000), anti-Ago2 (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab57113; WB: 2.5µg/ml; IP: 5µg/ml), anti-GW182 [4B6] (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab15843; WB: 2µg/ml; IP: 5µg/ml) and rabbit polyclonal anti-PMP70 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, P-0497; WB: 1µg/ml; IP: 2µg/ml), anti-PrP (Abcam, Cambridge, MA, USA, ab703; WB: 1/2000; IP: 4µl). Secondary antibodies were rabbit (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe,

Beaudoin et al.

QC, CA, NA934V; WB:1/5000) or mouse IgG HRP (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe, QC, CA, NA931V; WB: 1/5000). Secondary antibody for the immunogold labelling was rabbit IgG 12nm gold bead (Jackson immunoresearch laboratories inc., West Grove, PA, USA, 111205144; IGS: 1/20).

### **Cloning and plasmids**

All primers were purchased from IDT and their sequences are outlined in Table S1. Cloning of PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>GFP</sup> in pcDNA3.1(+)/pCEP4 $\beta$  (Invitrogen, Burlington, ON, CA) was described previously (Grenier et al., 2006). PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> and PrP $\Delta$ OR (deletion of amino acids 41-92) were cloned by PCR overlap. CyPrP (Grenier et al., 2006) was inserted into pGFPC1, and CyPrP<sup>GFP</sup> was transferred into pcDNA3.1(+). E200K, D178N and P102L mutants were cloned by PCR overlap. Q160X and Y145X mutants were generated from PrP<sup>C</sup> by standard PCR. PCR products were then introduced in HindIII and BamHI restriction sites of pcDNA3.1(+). All constructs were sequenced in both orientations. pGL3 control vector (E1741) and pRL-TK (E2241) vector were obtained from Promega (Cambridge, MA, USA) and pRL-TK let-7a (plasmid #11324) from Addgene (Cambridge, MA, USA).

### **Cells culture and transfections**

Mouse neuroblastoma N2a, human embryonic kidney HEK293 and cervical HeLa cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal bovine serum and non-essential amino acid (Wisent, Montreal, QC, CA). For immunofluorescence experiments, N2a and HEK293 cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in

Beaudoin et al.

24-well plates were transfected with PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>C</sup> mutants using GeneCellin transfection reagent (BioCellChallenge, Toulon, cedex 9, FR), according to the manufacturer's instructions.

For miRNA activity measurements in rescue experiments in Fig 2 and S3 HEK293 and HeLa cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with 10 nM PrP<sup>C</sup> siRNA-6 (QIAGEN, CA, USA) and control siRNA. Control is an Allstars negative control siRNA (QIAGEN, CA, USA). All siRNA that we used are unmodified. Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, empty vector, PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>ΔOR</sup> constructs were transfected for 24 h with GeneCellin. After 24 h, cells were co-transfected with pRL-TK let-7a or pRL-TK and pGL3 plasmids at equal molar ratio with GeneCellin. The day after, measurement of luciferase activities were performed as described later.

For miRNA activity measurements in PrP<sup>C</sup> knockdown experiments (Fig S2 and S3), HEK293 and HeLa cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with 10 nM siRNA-1 (QIAGEN, CA, USA), siRNA-6 (QIAGEN, CA, USA), siRNA-7 (QIAGEN, CA, USA), or shRNA *PRNP-5* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Controls were control siRNA (QIAGEN, CA, USA) and control shRNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's protocol. After 48 h, cells were co-transfected with pRL-TK let-7a or pRL-TK and pGL3 plasmids at equal molar ratio with GeneCellin. The day after, measurement of luciferase activities were performed as described later.

Beaudoin et al.

For miRNA activity measurements with PrP<sup>C</sup> mutants in Fig 3, HEK293 and HeLa cells seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates were transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>C</sup> mutants using GeneCellin. After 24 h, cells were co-transfected with pRL-TK or pRL-TK let-7a and pGL3 plasmids. The day after, measurement of luciferase activities were performed as described later.

### **Immunofluorescence and confocal microscopy**

For the immunofluorescence against Lamp-1, cells were fixed in 4% paraformaldehyde 20 min. For the other immunofluorescence experiments, cells were fixed with methanol 10 min at -20°C and immunofluorescence was performed according to the antibodies manufacturer's protocol. Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to an inverted microscope with a 63× oil immersion objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 405 nm (diode laser), 488 nm (40 mW argon laser) and 633 nm (helium–neon laser) and signals were collected sequentially. Serial horizontal optical sections of 320 X 320 pixels were taken at 0,5 μm intervals through the entire thickness of cells. Images were typically acquired from cells with similar size from each experimental condition using identical instrumental settings. For illustration purposes images were pseudocolored according to their original fluorochromes, merged (FluoView software, Olympus), cropped and assembled (Adobe Photoshop software, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Beaudoin et al.

### **Luciferase assays**

Luciferase activities were measured with the Dual-luciferase Reporter Assay kit (Promega, Cambridge, MA, USA,) according to the manufacturer's protocol using a Glomax 20/20 luminometer (Promega, Cambridge, MA, USA,) in parallel with western blot analysis.

### **Immunoprecipitation and Western Blot**

Immunoprecipitations were performed as previously described (Beaudoin et al., 2009). For GFP-tagged proteins, the chromotek GFP-trap immunoprecipitation system (Allele Biotech-Innovative Technology, San Diego, CA, USA) was used. For other proteins, protein A/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-2003) were used. Twenty-five micrograms of each lysate (10%) was loaded on the gel (input) with total immunoprecipitation reactions. Other western blots were performed as previously described (Goggin et al., 2008).

### **Northern Blot**

Total RNA was purified by mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Burlington, ON, CA; AM1560). 100 µg of total RNA was fractionated on a 15% polyacrylamide gel for 1 h and transferred into Hybond-H + transfer membrane (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfe, QC, CA). Following transfer, RNA was crosslinked to the membrane using a UV crosslinker. Oligonucleotide complementary to the target let-7a miRNA or 5S ribosomal RNA were radiolabelled using gamma-<sup>32</sup>P ATP and T4 polynucleotide kinase (Life Technologies, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's protocol.

Beaudoin et al.

Membranes were hybridized with the labeled probes using hybridization buffer (50% formamid, 5X SSC, 1% SDS, 5% Denhardt, 100 µg/ml salmon sperm DNA) for 18 h at 42°C. After hybridization, membrane were washed twice with 2X SSC, 0.2% SDS and three times with 0.2% SSC, 0.02% SDS, exposed to a phosphorscreen (GE Healthcare), scanned using a Typhoon apparatus (GE Healthcare) and quantified using the ImageQuant software (GE Healthcare).

### **qRT-PCR**

Total RNA was purified prior to let-7a miRNA and reference GAPDH mRNA quantification by the modified oligo(dT) method as described by Fiedler and al. (REF : Quantitative RT-PCR methods for Mature microRNA eExpression Analysis, Methods in Mol Bio 2010). Briefly, total RNA was extracted from cells with Qiazol (Qiagen, Germantown, MD, USA), and 250 ng of RQ1 DNase-treated RNA (Promega, Cambridge, MA, USA) was reverse transcribed using the miScript RT II kit from Qiagen with the HiFlex buffer. Quantitative PCR was performed on 1/5<sup>th</sup> of the RT reactions to measure relative GAPDH mRNA and let-7a miRNA with a Corbett's Rotor-Gene 6000 (Qiagen), using Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Burlington, ON, CA) and the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen), respectively. GAPDH primer set was Forward 5'-GTG GTC TCC TCT GAC TTC AAC-3' and Reverse 5'- GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC-3'; let-7a primers set was obtained in the miScript Primer Assays (Qiagen, Germantown, MD, USA).



**Exosome purification, quantification and characterization.**

HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% exosome-depleted heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent, Montreal, QC, CA). Cells plated at  $4 \times 10^6$  cells in 100 mm petri dishes were transfected 24 h later with empty vector, wild-type or mutant PrP<sup>C</sup> and the culture medium was changed 8 h post-transfection. After 24h, the culture medium was collected and secreted microvesicles were purified using the ExoQuick-TC purification kit (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer's protocols.

Purified secreted microvesicle material from cells cultured in exosome depleted medium was measure (size and number of particles) by using the NS500 Nanoparticle Tracking Analysis System (NanoSight, Amesbury, UK). Three videos of 60 seconds were recorded for each sample diluted 1/100 to allow accurate analysis with a shutter speed fixed at 50 and a camera gain of 347. The data was analyzed with the Nanoparticle Tracking Analysis software (automatic detection threshold level 25, automatic blur, minimum expected particle size 50 nm). Data are presented as the average and standard deviation of the three video recordings of each replicat.

The CD63 ExoELISA kit (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) was used to quantified CD63 positive secreted particles.

For the characterization experiments (electron microscopy, immunogold labelling and western blots), pellets of purified vesicles were resuspended in PBS and 1/10<sup>th</sup> was used for analysis.

**Immunogold labeling and electron microscopy**

Beaudoin et al.

For conventional electron microscopy,  $1/10^{\text{th}}$  of resuspended exosomes was applied for 1 h to copper grids. After, the grids were incubated 10 min in 2% paraformaldehyde. The samples were post-fixed with 2.5% glutaraldehyde for 10 min and several washing steps with deionized water were done before the coloration step. Coloration was done with 2% uranyl acetate for 15 min and the samples were embedded with a drop of 0.13% methyl cellulose and 0.4% uranyl acetate for 5 min. After drying, the samples were examined with an Hitachi electron microscope operated at 80 kV.

For the immunolabeling, following the first fixation step, the grids were incubated with 30  $\mu\text{l}$  of primary antibody diluted in 0.1% BSA/PBS 1X for 1 h. After several washing steps, the grids were incubated for 1 h with 30  $\mu\text{l}$  of an anti-rabbit antibody coupled with 12 nm gold beads. The samples were post-fixed and the subsequent steps were identical to conventional electron microscopy.

### **Densitometric analyses and statistical analyses**

All densitometric analyses were performed using Image J software. All values obtained for cells lysate were normalised with actin and are expressed as means  $\pm$  s.d. All statistical analyses were performed with Sigma Plot.

Beaudoin et al.

**Supplementary data**

Supplementary Data are available at RNA journal Online: Supplementary Table 1,

Supplementary Figures 1-5, Supplementary Figure legends.

Beaudoin et al.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the people at the electron microscopy platform at the Faculty of Medicine, University of Sherbrooke. This work was supported by a grant from Canadian Institutes for Health Research to X.R. (MOP -89881). S.B. was supported by a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## REFERENCES

- Aguzzi A, Steele AD. 2009. Prion topology and toxicity. *Cell* 137:994-996.
- Alier K, Ma L, Yang J, Westaway D, Jhamandas JH. 2011. Abeta inhibition of ionic conductance in mouse basal forebrain neurons is dependent upon the cellular prion protein PrPC. *J Neurosci* 31:16292-16297.
- Antony H, Wiegmans AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL. 2012. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 31:1-19.
- Ashok A, Hegde RS. 2009. Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. *PLoS Pathog* 5:e1000479.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 14:677-685.
- Beaudoin S, Vanderperre B, Grenier C, Tremblay I, Leduc F, Roucou X. 2009. 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. *Biochim Biophys Acta* 1793:335-345.
- Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. 2012. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.*
- Bremer J, O'Connor T, Tiberi C, Rehrauer H, Weis J, Aguzzi A. 2010. Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS One* 5:e12450.

Beaudoin et al.

Castilla-Llorente V, Spraggon L, Okamura M, Naseeruddin S, Adamow M, Qamar S, Liu J. 2012. Mammalian GW220/TNGW1 is essential for the formation of GW/P bodies containing miRISC. *J Cell Biol* 198:529-544.

Chakrabarti O, Hegde RS. 2009. Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration. *Cell* 137:1136-1147.

Chekulaeva M, Parker R, Filipowicz W. 2010. The GW/WG repeats of Drosophila GW182 function as effector motifs for miRNA-mediated repression. *Nucleic Acids Res* 38:6673-6683.

Coleman BM, Hanssen E, Lawson VA, Hill AF. 2012. Prion-infected cells regulate the release of exosomes with distinct ultrastructural features. *Faseb J* 26:4160-4173.

El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T. 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21:2539-2544.

Dores MR, Paing MM, Lin H, Montagne WA, Marchese A, Trejo J. 2012. AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Mol Biol Cell*. 23:3612-3623.

Eulalio A, Triteschler F, Izaurralde E. 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 15:1433-1442.

Gawinecka J, Cardone F, Asif AR, De Pascalis A, Wemheuer WM, Schulz-Schaeffer WJ, Pocchiari M, Zerr I. 2012. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease subtype-specific alterations of the brain proteome: Impact on Rab3a recycling. *Proteomics*.

Beaudoin et al.

Ghose J, Sinha M, Das E, Jana NR, Bhattacharyya NP. 2011. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease. *PLoS One* 6:e23837.

Gibbings D, Leblanc P, Jay F, Pontier D, Michel F, Schwab Y, Alais S, Lagrange T, Voinnet O. 2012. Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 19:517-524, S511.

Gibbings D, Voinnet O. 2010. Control of RNA silencing and localization by endolysosomes. *Trends Cell Biol* 20:491-501.

Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. 2009. Multivesicular bodies associated with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11:1143-1149.

Goff LA, Davila J, Swerdel MR, Moore JC, Cohen RI, Wu H, Sun YE, Hart RP. 2009. Ago2 immunoprecipitation identifies predicted microRNAs in human embryonic stem cells and neural precursors. *PLoS One* 4:e7192.

Goggin K, Beaudoin S, Grenier C, Brown AA, Roucou X. 2008. Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. *Biochim Biophys Acta* 1783:479-491.

Grenier C, Bissonnette C, Volkov L, Roucou X. 2006. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem* 97:1456-1466.

Higashi S, Moore DJ, Yamamoto R, Minegishi M, Sato K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Hino H, Kosaka K, Emson PC, Wada K, Dawson VL, Dawson TM, Arai

Beaudoin et al.

H, Iseki E. 2009. Abnormal localization of leucine-rich repeat kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:994-1005.

Hurley JH, Odorizzi G. 2012. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* 14:654-655.

Jansson MD, Lund AH. 2012. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*.

Jodoin J, Laroche-Pierre S, Goodyer CG, LeBlanc AC. 2007. Defective retrotranslocation causes loss of anti-Bax function in human familial prion protein mutants. *J Neurosci* 27:5081-5091.

Karlowski WM, Zielezinski A, Carrere J, Pontier D, Lagrange T, Cooke R. 2010.

Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 38:4231-4245.

Kovacs GG, Gelpi E, Strobel T, Ricken G, Nyengaard JR, Bernheimer H, Budka H.

2007. Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:628-636.

Kristiansen M, Messenger MJ, Klohn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Tabrizi

SJ. 2005. Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 280:38851-38861.

Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim JH, Huh JY, Yoon H, Park DK, Lim JY, Kim JM, Jeon D,

Ryu H, Lee SK, Kim M, Roh JK. 2012. miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Ann Neurol* 72:269-277.

Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim do

H, Cho IS, Nakahara K, Preall JB, Bellare P, Sontheimer EJ, Carthew RW. 2009.

Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 11:1150-1156.



Beaudoin et al.

Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Aronin N, Difulgia M. 2010. Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 30:4552-4561.

Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM, Bhattacharjee S. 2012. Spreading of Alzheimer's disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA. *Neuroreport* 23:621-626.

MacDonald C, Buchkovich NJ, Stringer DK, Emr SD, Piper RC. 2012. Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Rep* 13:331-338.

Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C. 2009. Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog* 5:e1000426.

Massignan T, Biasini E, Lauranzano E, Veglianesi P, Pignataro M, Fioriti L, Harris DA, Salmona M, Chiesa R, Bonetto V. 2010. Mutant prion protein expression is associated with an alteration of the Rab GDP dissociation inhibitor alpha (GDI)/Rab11 pathway. *Mol Cell Proteomics* 9:611-622.

Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, Marti E. 2011. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 20:3067-3078.

Mishra RS, Bose S, Gu Y, Li R, Singh N. 2003. Aggresome formation by mutant prion proteins: the unfolding role of proteasomes in familial prion disorders. *J Alzheimers Dis* 5:15-23.

Beaudoin et al.

Montag J, Brameier M, Schmadicke AC, Gilch S, Schatzl HM, Motzkus D. 2012. A genome-wide survey for prion-regulated miRNAs associated with cholesterol homeostasis. *BMC Genomics* 13:486.

Pal A, Severin F, Lommer B, Shevchenko A, Zerial M. 2006. Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172:605-618.

Peralta OA, Huckle WR, Eyestone WH. 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 81:68-77.

Prusiner SB. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.

Satoh J, Obayashi S, Misawa T, Sumiyoshi K, Oosumi K, Tabunoki H. 2009. Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:16-35.

Savas JN, Makusky A, Ottosen S, Baillat D, Then F, Krainc D, Shiekhatter R, Markey SP, Tanese N. 2008. Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10820-10825.

Shah AA, Meese E, Blin N. 2010. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review. *J Appl Genet* 51:501-507.

Singh A, Isaac AO, Luo X, Mohan ML, Cohen ML, Chen F, Kong Q, Bartz J, Singh N. 2009. Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders. *PLoS Pathog* 5:e1000336.

Beaudoin et al.

Spielhauer C, Schatzl HM. 2001. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276:44604-44612.

Stella R, Massimino ML, Sandri M, Sorgato MC, Bertoli A. 2010. Cellular prion protein promotes regeneration of adult muscle tissue. *Mol Cell Biol* 30:4864-4876.

Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S. 2009. Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *Rna* 15:1078-1089.

Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM. 2012. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15:1227-1235.

Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, Mori H. 2011. Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 89:1031-1042.

Wadsworth JD, Collinge J. 2007. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:598-609.

Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, Hooper NM. 2012 Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nat Commun* 3:1134.

Zafar S, von Ahnen N, Oellerich M, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Armstrong VW, Asif AR. 2011. Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *J Proteome Res* 10:3123-3135.

Beaudoin et al.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302:1-12.

**FIGURE LEGENDS:**

**Figure 1 PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of miRISC, Ago2 and GW182 proteins, on MVB organelles of N2a cells.** (A) Confocal microscopy of endogenous PrP<sup>C</sup> (green channel) with GW182 or Ago2 (red channel). (B) MVBs localization is confirmed by confocal microscopy of PrP<sup>C</sup> with Alix, CD63 and Rab7 (upper, middle and lower panels, respectively). Right panels represent the overlapping green and red signals. Scale bar : 5  $\mu$ m. (C) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is determined by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 in PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 immunoprecipitates (IP). PrP<sup>C</sup> was immunoprecipitated with monoclonal antibody SAF32. (D) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is confirmed by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 after PrP<sup>C</sup> immunoprecipitation with polyclonal antibodies. (E) Co-immunoprecipitation specificity is confirmed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2, PrP<sup>C</sup> and PMP70 after immunoprecipitation of PMP70. Input represent 10% of lysate used for IP. (F) The implication of OR was confirmed by western blot analyses of Ago2 and PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> after immunoprecipitation of GFP from N2a cells expressing PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup>.

**Figure 2 Efficient miRNA activity depends on the OR of PrP<sup>C</sup>.** (A) Diagram of Renilla luciferase (RLuc) and Firefly luciferase (FLuc) activity reporters. RLuc activity is normalized to FLuc activity. The let-7a miRNA activity is determined by the ratio of normalized RLuc activity from a construct with two let-7a target sites in the 3'UTR to the normalized RLuc activity from a construct with no let-7a target sites in the 3'UTR. (B)

Beaudoin et al.

Diagram of the experimental design. (C). The let-7a miRNA activity was determined in HEK293 cells treated with a control siRNA or PrP<sup>C</sup> siRNA-6. After 24 h, cells were either transfected with empty vector (PrP<sup>C</sup> siRNA-6), a vector expressing PrP<sup>C</sup> (rescue PrP<sup>C</sup>) or a vector expressing PrP<sup>ΔOR</sup> (rescue PrP<sup>ΔOR</sup>). The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA. Error bars indicate s.d. (n = 4; student's t-test \**P* < 0,001, \*\**P* = 0,008 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method *P* < 0,001). (D) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown and rescue in HEK293 cells. Note that a long exposure time was required to detect endogenous PrP<sup>C</sup> expression and knockdown, compared to PrP<sup>C</sup> knockdown rescued with PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>ΔOR</sup>. Actin was used as a loading control. A representative experiment from n = 4 is shown. Densitometric analyses show that PrP<sup>C</sup> levels were reduced from 100% to 6% with siRNA-6, as indicated below the blots (s.d. = 11; student's t-test *P* < 0,001).

**Figure 3 PrP<sup>C</sup> familial mutants and CyPrP, an artificial mutant, inhibit miRNA activity.** (A) Diagram of the experimental design. (B) miRNA activity was determined as described in Fig. 2A, and normalized with mock-transfected HEK293 cells expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup> (Mock; dotted line). Errors bars indicate s.d. (n = 4; Paired t-test \**P* < 0,05 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method *P* < 0,001, validated for comparison to Mock and PrP<sup>C</sup> overexpression). n.s., not significant. (C) Northern blot analysis shows that let-7a miRNA processing by PrP<sup>C</sup> and PrP mutants expression. (D) Quantitative RT-PCR confirms that PrP mutants and PrP<sup>C</sup> expression does not affect let-7a miRNA production. Errors bars indicate s.d

**Figure 4** **Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect MVBs maturation.** (A) MVB organelles (arrows) are visualized by confocal microscopy of endogenous Alix (red channel) in N2a cells transfected with PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel). Scale bars: 5  $\mu$ m. (B) Western blot of endogenous Alix,  $\beta$ -actin and transfected PrP<sup>C</sup> constructs. Densitometric analyses indicate that Alix levels (normalized to actin levels) do not change significantly in cells expressing different PrP mutants compared to cells expressing wild-type PrP<sup>C</sup>, as indicated below Alix blots (n = 3; s.d. = 5 for E200K, 9 for D178N, 9 for P102L, 11 for Q160X, 12 for Y145X, 7 for CyPrP; student's t-test  $P > 0.05$ ). (C) Immunolocalization of GW182 (red channel) in N2a cells indicates the presence of large MVBs (arrow) in cells expressing PrP<sup>C</sup>, in contrast to cells expressing PrP<sup>C</sup> familial mutants (green channel). Scale bars: 5  $\mu$ m. (D) Western blot analyses of endogenous GW182,  $\beta$ -actin and PrP-transfected proteins confirm overall equal amounts of GW182.

**Figure 5** **Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect lysosomes morphology.**

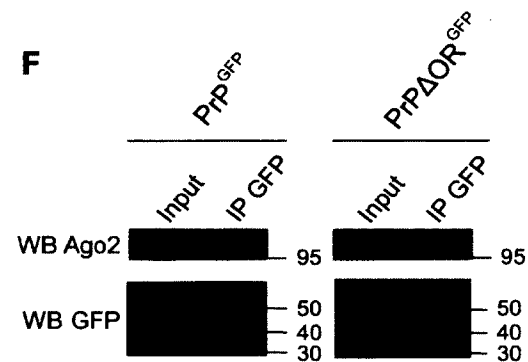
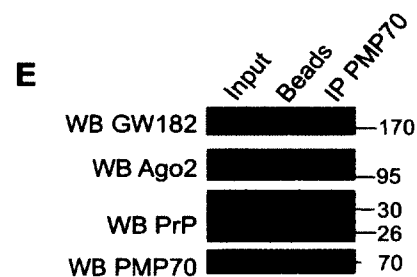
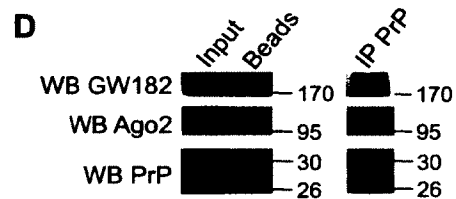
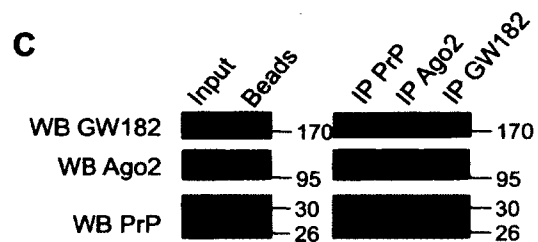
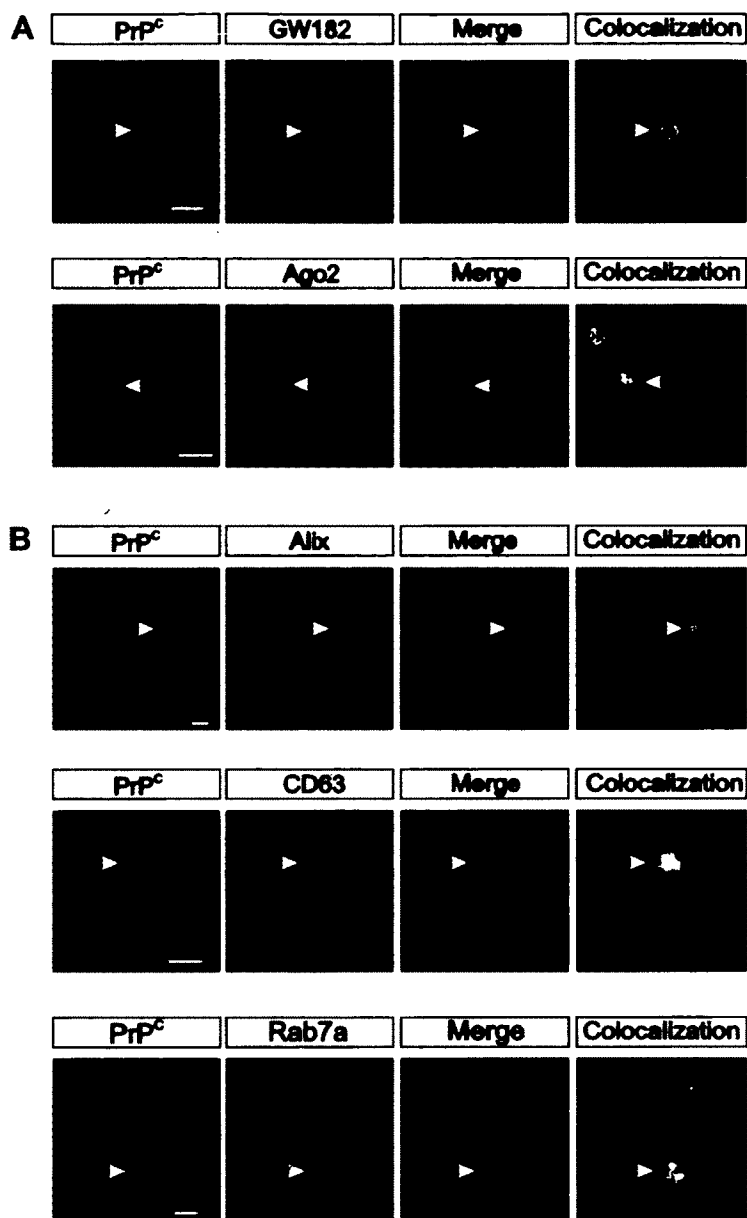
(A) Lysosomes are visualized by confocal microscopy of endogenous Lamp-1 (red channel) in N2a cells transfected with PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel). Scale bars: 5  $\mu$ m. (D) Western blot of endogenous Lamp-1,  $\beta$ -actin and transfected PrP<sup>C</sup> constructs. Densitometric analyses indicate that Lamp-1 levels (normalized to actin levels) do not change significantly in cells expressing different PrP mutants compared to cells expressing wild-type PrP<sup>C</sup>, as indicated below Lamp-1 blots (n = 3; s.d. = 11 for E200K, 8 for D178N, 10 for P102L, 13 for Q160X, 12 for Y145X, 7 for CyPrP; student's t-test  $P > 0.05$ )

**Figure 6. Familial PrP<sup>C</sup> mutants and CyPrP affect MVBs-related secreted vesicles.**

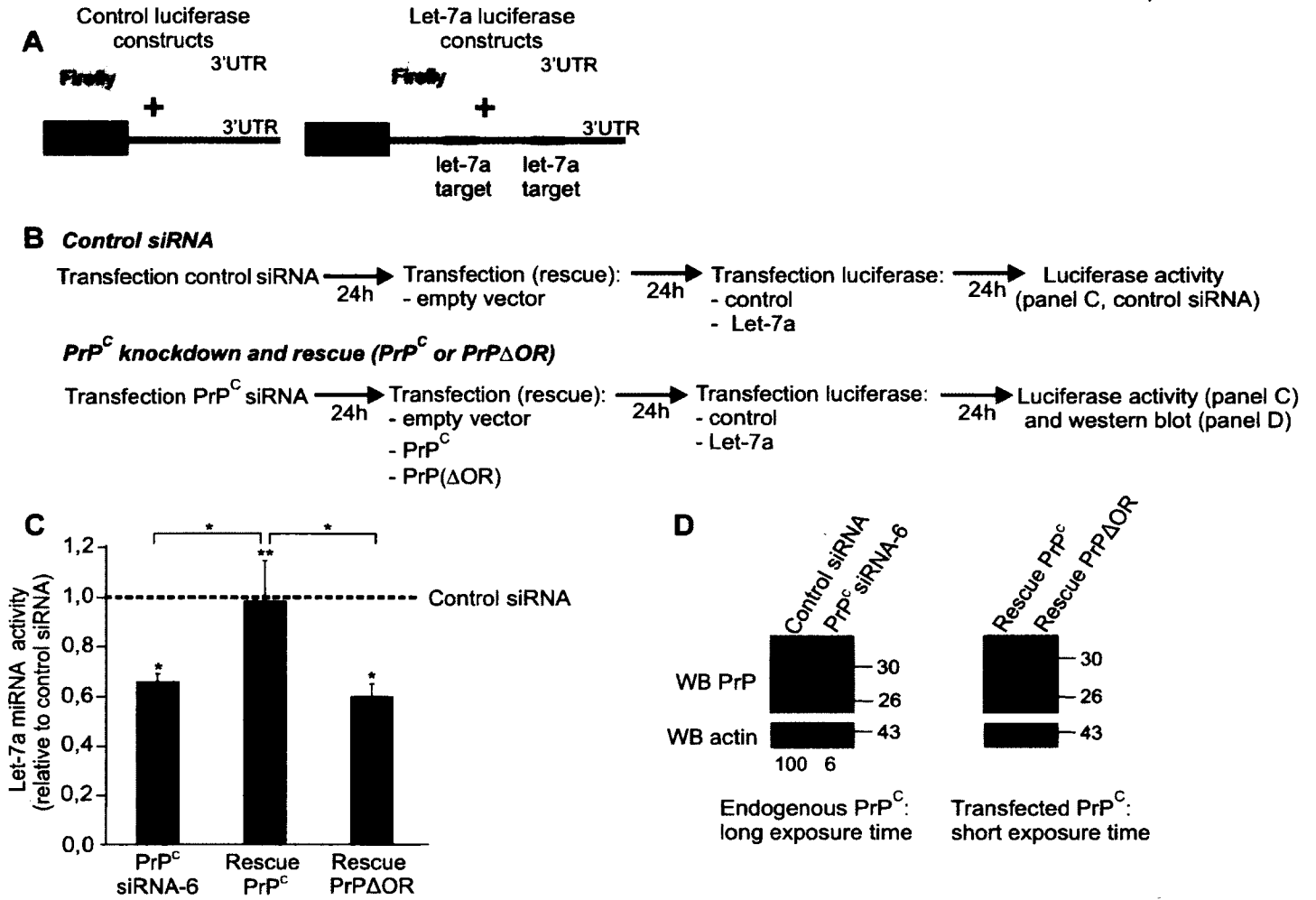
(A) Exosomes quantified by ELISA of CD63 on purified exosomes from HEK293 cells transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP mutants. Results are expressed as relative to exosomes secreted by PrP<sup>C</sup>-expressing cells (dotted line). Errors bars indicate s.d. (n = 3; Mann-Whitney Rank Sum Test \* $P = 0,002$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $P < 0,001$  for all mutants). (B) Western blot of Alix, CD63, Lamp-1 and  $\alpha$ -tubuline on purified secreted microvesicles such as exosomes from cells transfected with PrP<sup>C</sup> or PrP mutants. (C) Densitometric analyses show that each marker levels in microvesicles preparation from PrP mutants expressing cells were reduced. Errors bars indicate s.d. (n = 3 for Alix and CD63, n=2 for Lamp-1 and  $\alpha$ -tubulin; Paired t-test \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,025$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $P < 0,001$ ). (D) Western blot analyses of cellular CD63, Lamp-1,  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -actin and transfected PrP<sup>C</sup> constructs. Densitometric analyses (relative to actin levels) indicate that their cellular levels do not change significantly in cells expressing different PrP mutants compared to cells expressing wild-type PrP<sup>C</sup>, as indicated below presented blots (n = 3; s.d. = 21 for E200K, 28 for D178N, 6 for P102L, 9 for Q160X, 13 for Y145X, 20 for CyPrP; student's t-test  $P > 0.05$ ). (E) Nanoparticle Tracking Analysis of secreted exosomes ranging from 40 to 120 nm. Errors bars indicate s.d. (three replicates with three video for each replicate n=9; Paired t-test \* $P < 0,004$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P = 0,018$ ).



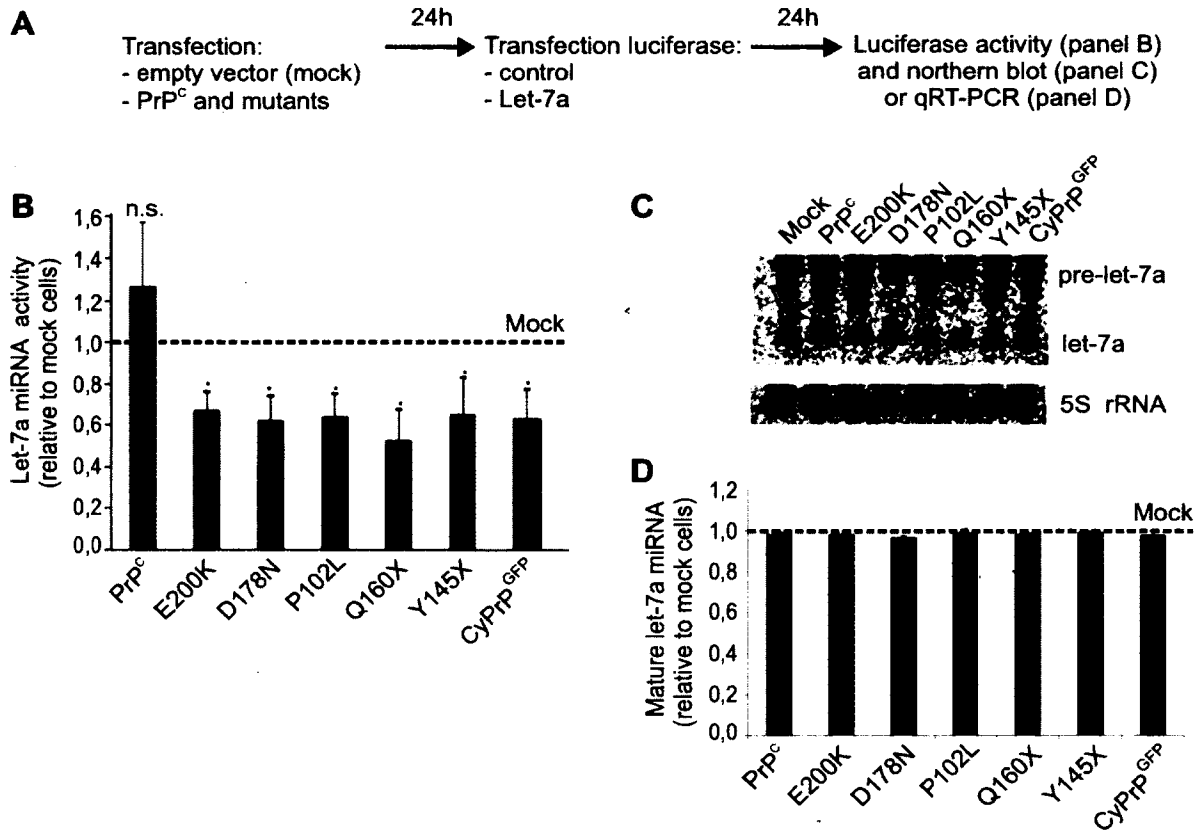
Figure 1



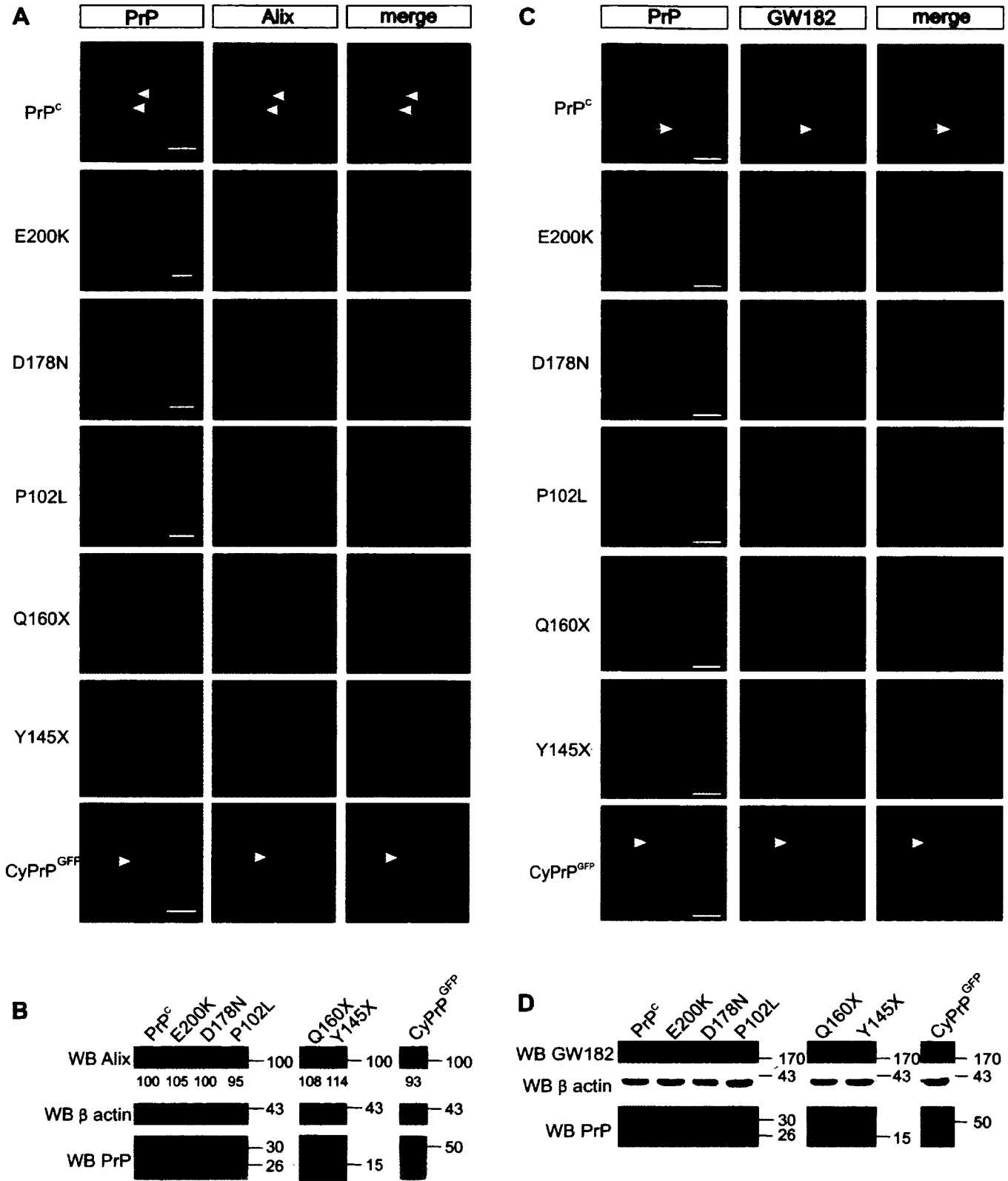
**Figure 2**



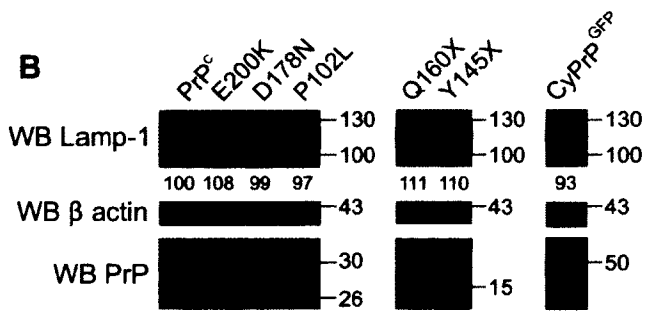
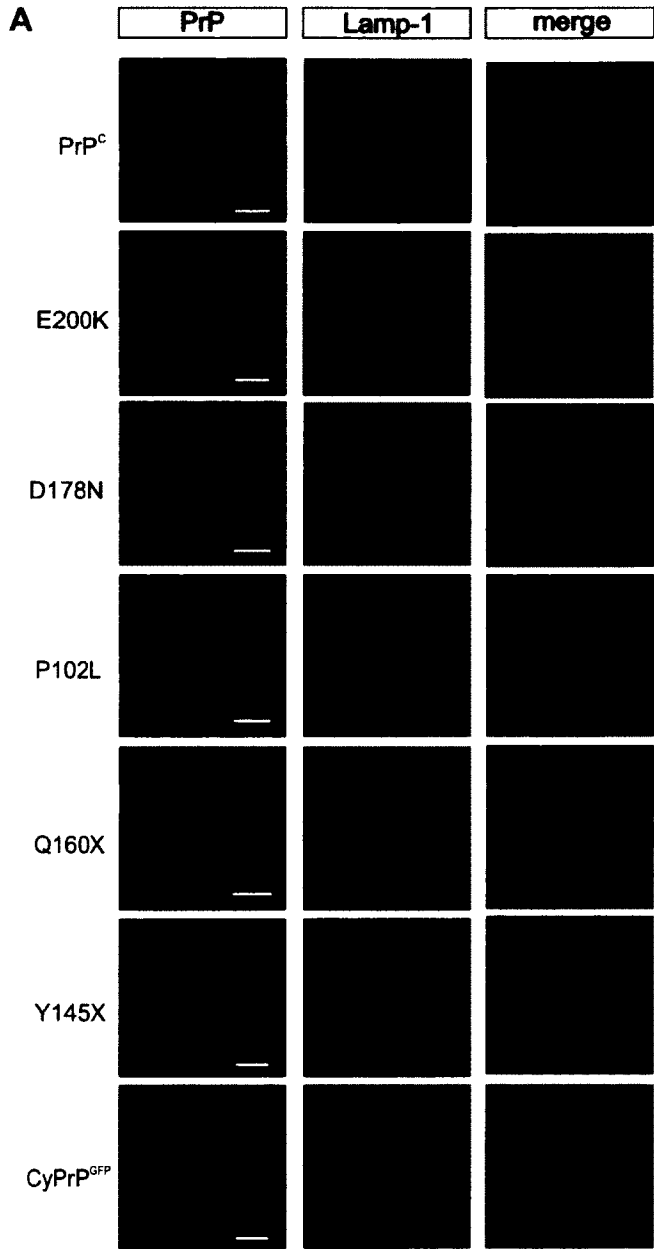
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

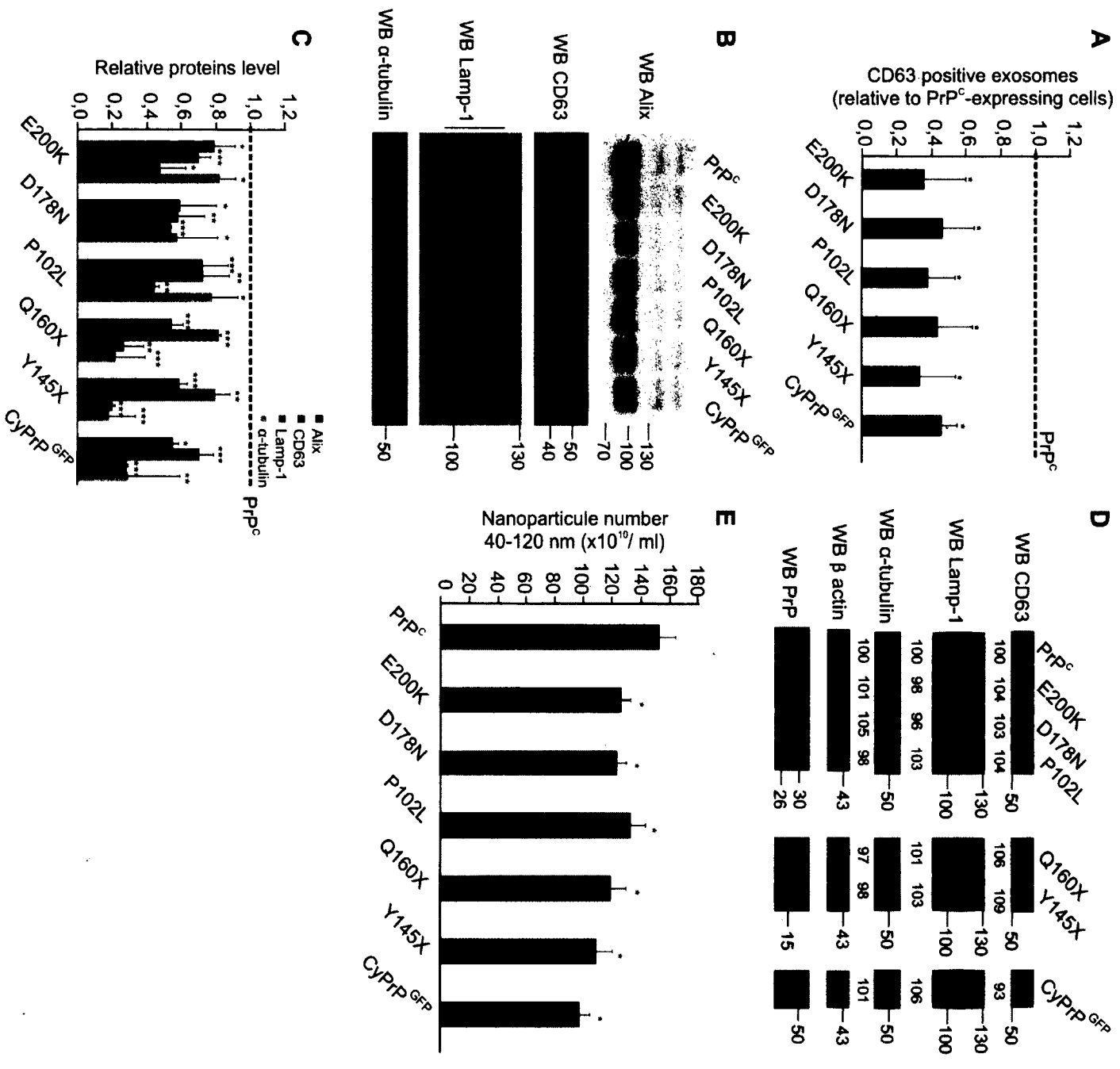
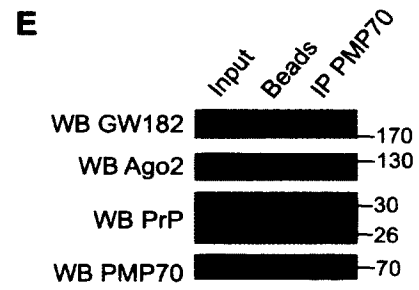
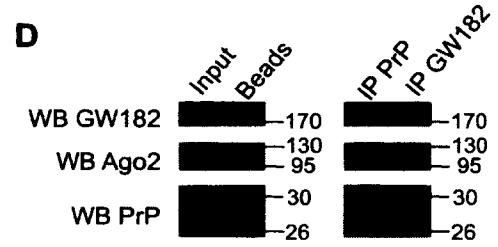
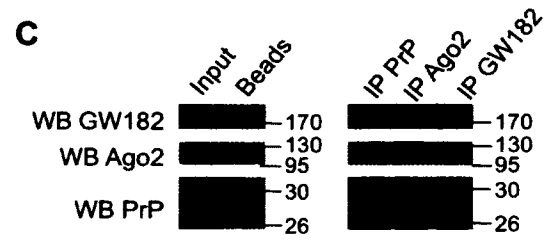
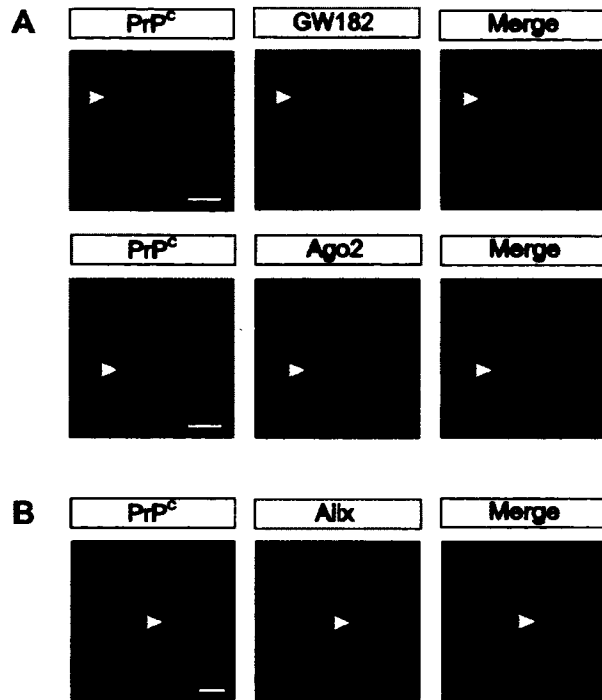
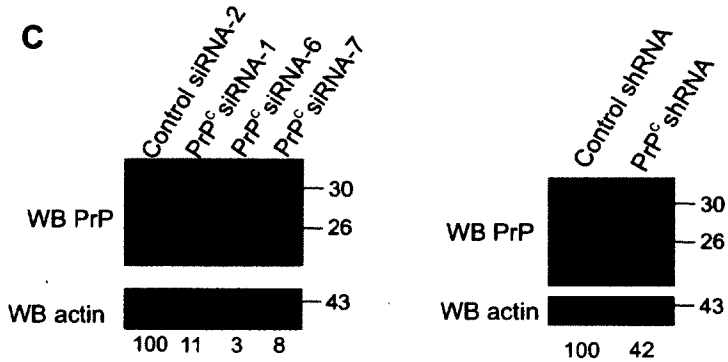
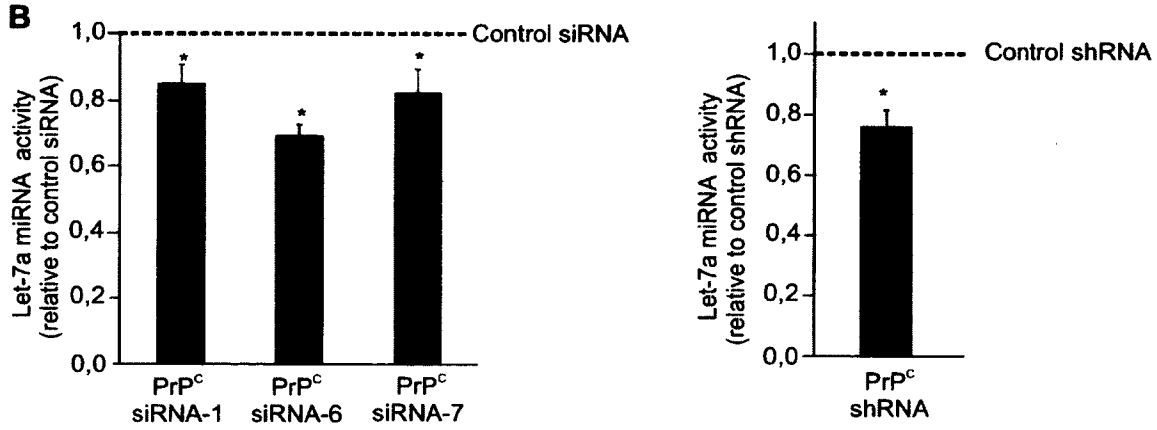
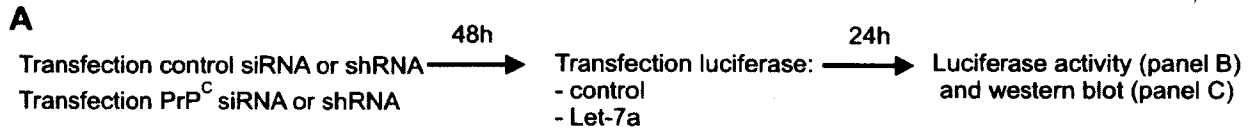


Figure S1

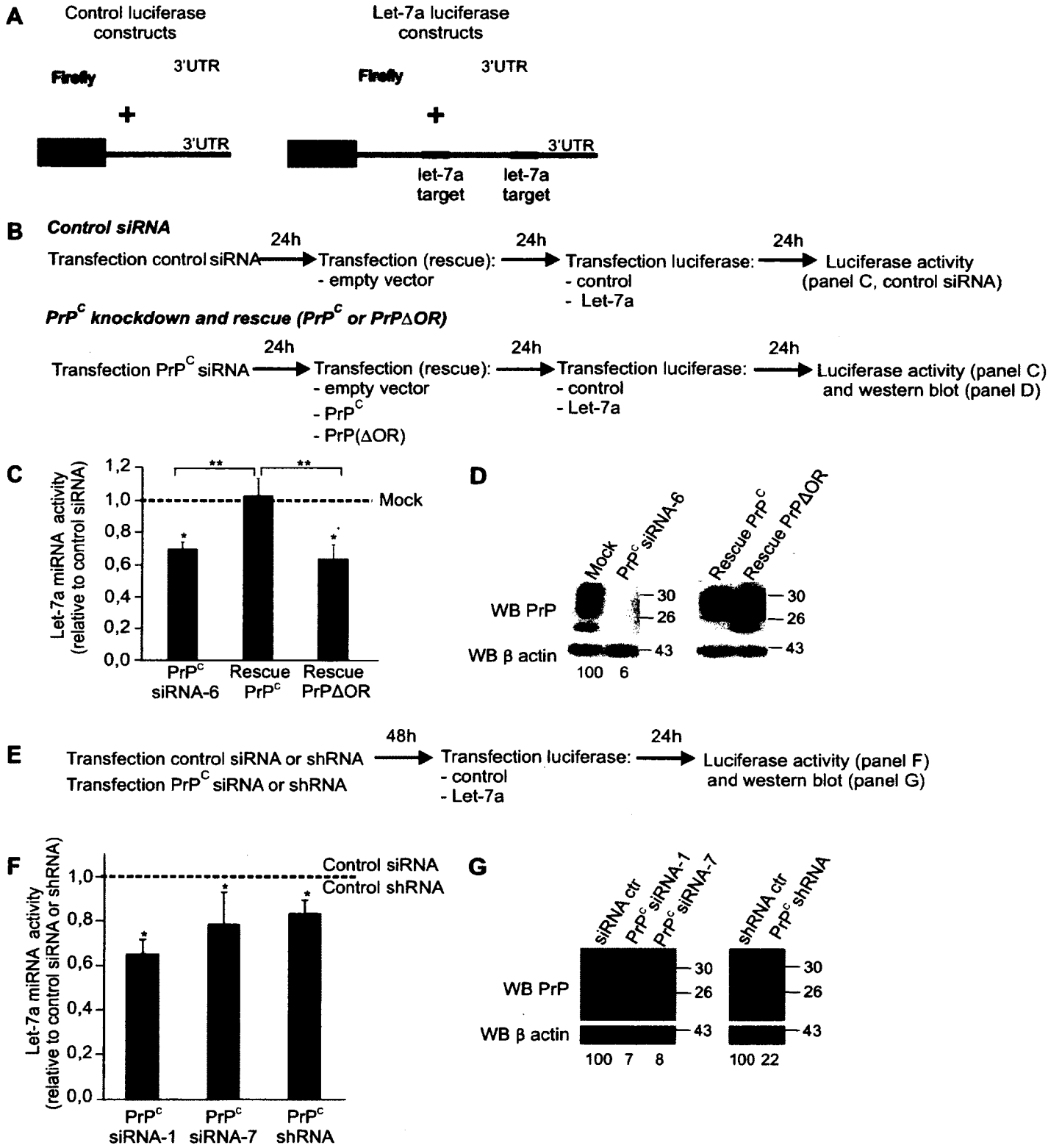


**Figure S2**





**Figure S3**



**Figure S4**

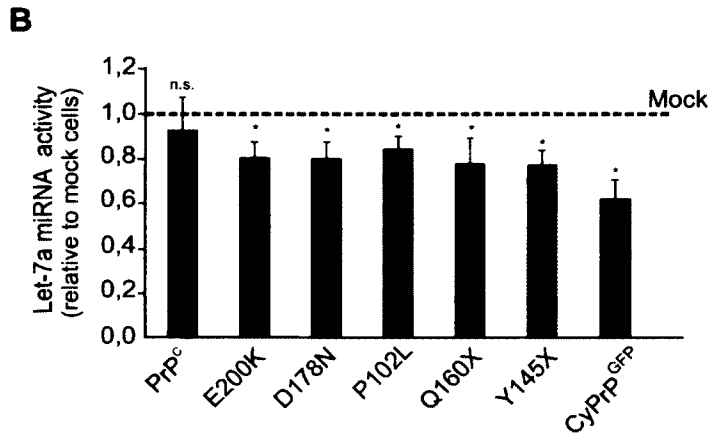
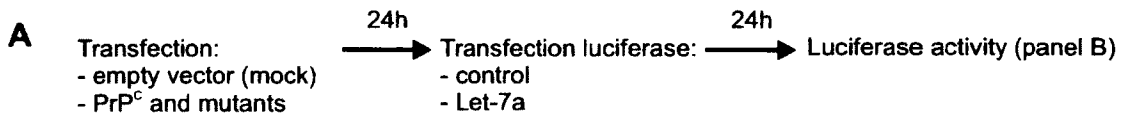
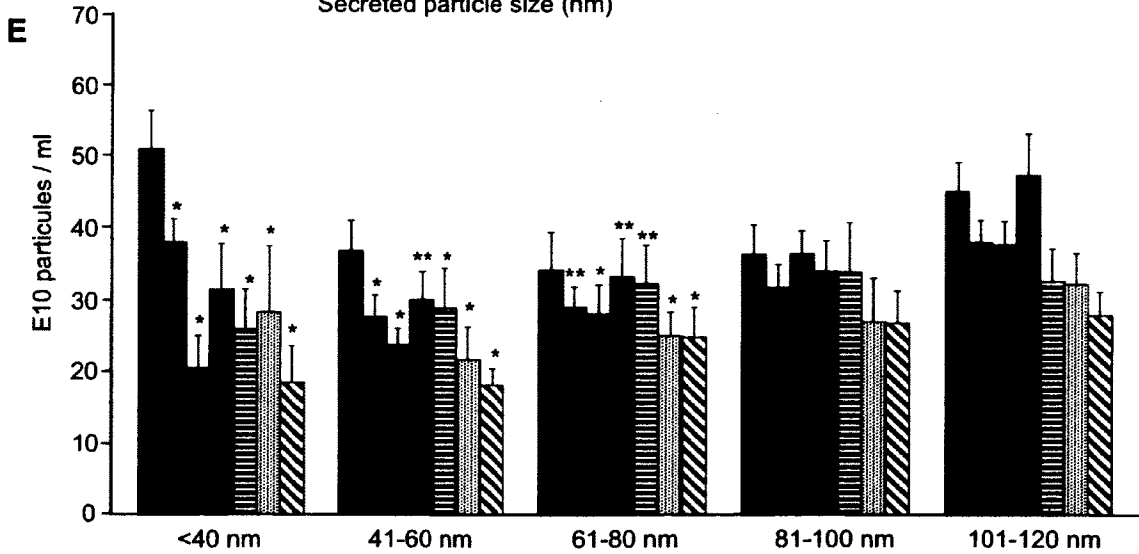
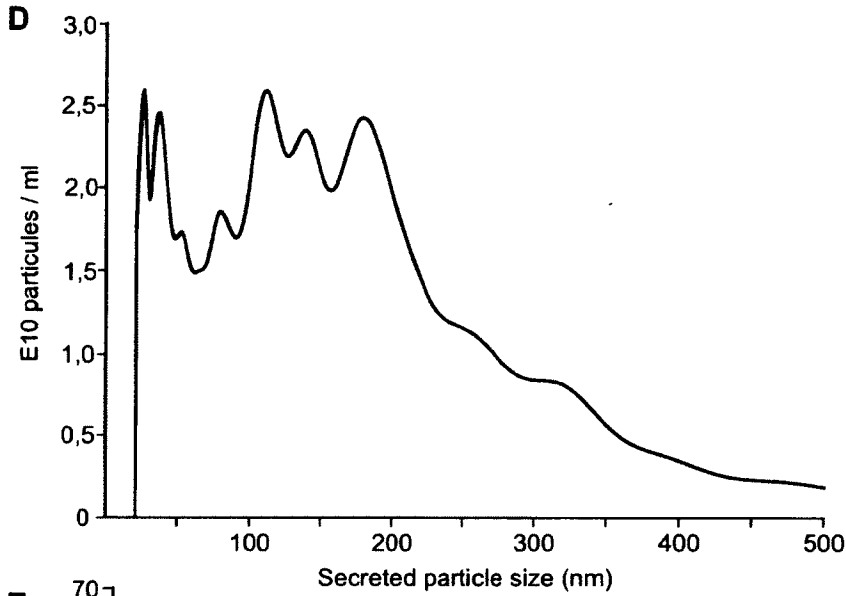
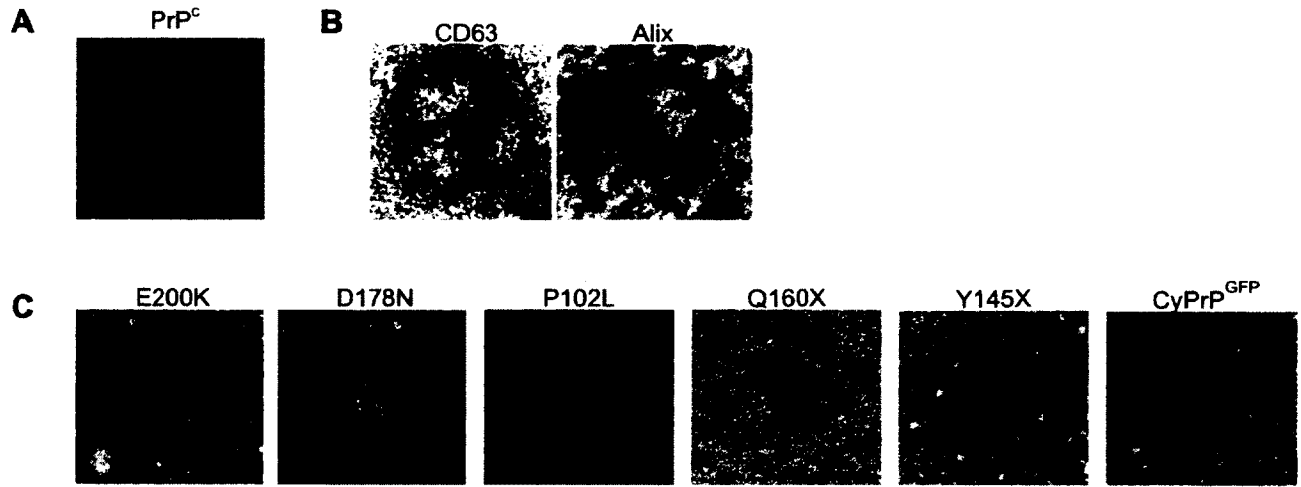


Figure S5



## Supplementary figure legends

**Figure S1 PrP<sup>C</sup> colocalizes and interacts with the core proteins of RISC, Ago2 and GW182 proteins, in MVB organelles of HEK293 cells.** (A) Confocal microscopy of endogenous PrP<sup>C</sup> (green channel) with GW182 or Ago2 (red channel). (B) MVB localization is confirmed by confocal microscopy of PrP<sup>C</sup> with Alix. Scale bar: 5  $\mu$ m. (C) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is revealed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2 and PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 IP. PrP<sup>C</sup> was immunoprecipitated with monoclonal antibody SAF32. (D) The interaction of PrP<sup>C</sup> with Ago2 and GW182 is confirmed by western blot analyses of endogenous PrP<sup>C</sup>, GW182 and Ago2 after PrP<sup>C</sup> immunoprecipitation with polyclonal antibodies and GW182 immunoprecipitation. (E) Co-immunoprecipitation specificity is confirmed by western blot analyses of endogenous GW182, Ago2, PrP<sup>C</sup> and PMP70 on PMP70 IP. Input represent 10% of lysate used for IP.

**Figure S2 siRNA and shRNA treatment against PrP<sup>C</sup> decrease let-7a miRNA activity.** (A) Diagram of the experimental design. (B) HEK293 cells were treated with a control siRNA or shRNA, or PrP<sup>C</sup> siRNA-1, siRNA-6, siRNA-7 at 10 nM or shRNA. The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA or shRNA. Error bars indicate s.d. (n = 4, student's t-test \* $P < 0,001$  and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $P < 0,001$ ). (C) A representative western blot confirms the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdowns. Actin was used as a loading control. Densitometric analyses indicate that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 11% (siRNA-1),

3% (siRNA-6), 8% (siRNA-7), and 42% (shRNA) as indicated below the blots (n = 4; s.d. = 9 for siRNA-1; s.d. = 7 for siRNA-7; s.d. = 19 for shRNA; student's t-test \* $P < 0,001$ ).

**Figure S3 Efficient miRNA activity is dependent on the OR of PrP<sup>C</sup> in Hela cells.**

(A) Diagram of Renilla luciferase (RLuc) and Firefly luciferase (FLuc) activity reporters. RLuc activity is normalized to FLuc activity. The let-7a miRNA activity is determined by the ratio of normalized RLuc activity from a construct with two let-7a target sites in the 3'UTR to the normalized RLuc activity from a construct with no let-7a target sites in the 3'UTR. (B) Diagram of the experimental design for panels C-D. (C) The let-7a miRNA activity (let-7a RLuc / RLuc) was determined in Hela cells treated with a control siRNA or PrP<sup>C</sup> siRNA-6 at 10 nM. After 24 h, cells were either transfected with empty vector (PrP<sup>C</sup> siRNA-6), a vector expressing PrP<sup>C</sup> (rescue PrP<sup>C</sup>) or a vector expressing PrP $\Delta$ OR (rescue PrP $\Delta$ OR). The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA. Error bars indicate s.d. (n = 4; student's t-test \* $P < 0,001$ ; \*\* $P = 0,002$ ; One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method  $P < 0,001$ ). (D) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown and rescue in Hela cells. Note that a long exposure time was required to detect endogenous PrP<sup>C</sup> expression and knockdown compared to PrP<sup>C</sup> knockdown rescued with PrP<sup>C</sup> or PrP $\Delta$ OR. Actin was used as a loading control. A representative experiment from n = 4 is shown. Densitometric analyses indicated that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 6% with siRNA-6, as indicated below the blots (s.d. = 4; student's t-test  $P < 0,001$ ). (E) Diagram of the experimental design for panels F-G. (F) HeLa cells were treated with a control siRNA or

shRNA, or PrP<sup>C</sup> siRNA-1, siRNA-7 or shRNA. The let-7a miRNA activity is expressed relative to control siRNA or shRNA. Error bars indicate s.d. (n = 4; student's t-test \**P* < 0,001, and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method *P* < 0,001). (G) Western blot analyses confirm the efficiency of PrP<sup>C</sup> knockdown with siRNA-1, siRNA-7 and the shRNA. Densitometric analyses indicated that PrP<sup>C</sup> levels (normalized to actin levels) were reduced from 100% to 7% (siRNA-1), 8% (siRNA-7), and 22% (shRNA) as indicated below the blots (n = 4; s.d. = 8 for siRNA-1; s.d. = 6 for siRNA-7; s.d. = 13 for shRNA; student's t-test *P* < 0,001).

**Figure S4 Familial PrP mutants decrease let-7a miRNA activity in HeLa cells.**

(A) Diagram of the experimental design. (B) Let-7a miRNA activity was determined as described in Fig. 2A, and normalized with mock-transfected cells expressing endogenous levels of PrP<sup>C</sup> (Mock; dotted line). Errors bars indicate s.d. (n = 4; Paired t-test \**P* = 0,029 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method *P* < 0,001, validated for comparison to Mock and PrP<sup>C</sup> overexpression). n.s., not significant.

**Figure S5 Familial PrP mutants affect exosomes.** (A) Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells transfected with PrP<sup>C</sup>. Scale bar, 100 nm. (B) Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells transfected with PrP<sup>C</sup> with immunogold labelling against CD63 or Alix. Scale bar, 20 nm. (C) Electron micrographs of exosomes isolated from the supernatant of cells expressing different PrP mutants. Scale bar, 100 nm. (D) Size distribution followed by NanoSight's Nanoparticle Tracking Analysis of purified secreted microvesicles prepared from

HEK293 cells expressing PrP<sup>C</sup> with the ExoQuick kit reveals a heterogeneous population that includes exosomes (40-120 nm). (E) Particle number distribution in 20 nm scale was determined by NanoSight's Nanoparticle Tracking Analysis for exosomes ranging from 40 nm to 120 nm. Errors bars indicate s.d. (n = 9; Paired t-test \* $P \leq 0,006$ ; \*\* $P \leq 0,044$ ).

P-BODIES AND STRESS GRANULES FORMATION ARE INHIBITED BY  
MISFOLDED PrP<sup>C</sup> AND INCREASED CELL SUSCEPTIBILITY

**Simon Beaudoin<sup>1</sup>, Guillaume Tremblay<sup>1</sup>, Julie Motard<sup>1</sup>, Xavier Roucou<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault,  
Sherbrooke, J1E 4K8 Quebec, Canada

To whom correspondence should be addressed: Dr Xavier Roucou, Department of  
Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3201 Jean Mignault,  
Sherbrooke, Québec J1E 4K8, Canada, Tel. (819) 821 8000x72240; Fax. (819) 820 6831;  
E-Mail: [xavier.roucou@usherbrooke.ca](mailto:xavier.roucou@usherbrooke.ca)

**Keywords:** Prion protein, miRNA, RNA-induced silencing complex, Prion diseases,  
Neurodegeneration, Multivesicular bodies

**Running title : PrP MUTANTS INHIBIT P-BODIES AND STRESS GRANULES**



Table S1: Oligonucleotides used to introduce mutations in PrP<sup>C</sup> or PrP<sup>GFP</sup>

Oligonucleotide Name	
<del>PC</del> WAGCTTGTAATGGCGAACCTTGGCTGCTGG	
<del>PC</del> GGATCCTCATCCCACATATCAGGAAGATG	
<del>PC</del> GORACCACAAGGAGGTGGCACCCACAGTCA	
<del>PC</del> ORCGTGTGGGTAGCGGTGCCTCCAG	
<del>PC</del> AOR <sup>GFP</sup> TGGTGCCACCTTGTACAGCT	
<del>PC</del> OR <sup>GFP</sup> TACWAGGGTGGCACCCACAGTCA	
<del>PC</del> IK <sup>GFP</sup> CGVIGGTGAAGTTCTCC	
<del>PC</del> A <sup>GFP</sup> QCFVACCCAAGACCGACG	
<del>PC</del> IA <sup>GFP</sup> ENRGGCAGTGTGCACAAAGTTG	
<del>PC</del> AD <sup>GFP</sup> ENCFGCACACTGCGTCAATATC	
<del>PC</del> PT <sup>GFP</sup> ACRA <sup>GFP</sup> GCTTGTCCACTG	
<del>PC</del> PT <sup>GFP</sup> QZLAPCAAGCTAGTAAGCC	
<del>PC</del> PA <sup>GFP</sup> Q <sup>GFP</sup> OX <sup>GFP</sup> TCCTCATTGGTTGGGGTAACGGTG	
<del>PC</del> PA <sup>GFP</sup> Y <sup>GFP</sup> GSX <sup>GFP</sup> TCCTCAATAGTCACTGCCGAAATGTATGATGG	

N.B. Introduced mutations are underlined in the oligonucleotide sequences.

## **Abstract**

Prion protein (PrP<sup>C</sup>) is involved in stress response to various cellular stresses such as oxidative, ER and thermal stress, but its exact function is still debated. Several studies reveal that PrP<sup>C</sup> misfolding induces cellular stress with an abnormal stress response which is responsible of the neurodegeneration process observed with prion disease. Here, we demonstrate that familial PrP mutants and infectious PrP scrapie induce constitutive eIF2 $\alpha$ -dependent stress response via PACT and PKR, without assembly of stress granules (SGs). Furthermore, we show that in condition of classic cellular stresses, PrP mutants decrease SGs formation, which reduces cell survival following stresses. We also found that P-bodies assembly, an another RNA granule closely related to SGs, are affected by misfolded PrP<sup>C</sup>, which cause an increase in siRNA activity. We propose that inhibition of these two RNA granules and their impact on normal cellular pathways may represent an important neurotoxic mechanism in prion diseases.

## **Introduction**

Prion diseases, also known as Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), are infectious fatal neurodegenerative disorders. TSEs are caused by a misfolded isoform of prion protein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) named PrP scrapie ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) which is infectious and self-propagating [1-3]. TSEs are sub-classified into three groups according to their acquisition mode: through an infection mode, a familial mutation or a sporadic phenomenon, each representing 5%, 10% and 85% of TSEs cases in humans, respectively [1, 2]. The underlying neurotoxic mechanism of TSEs is still misunderstood although we know that prions infectivity and toxicity depend on the expression of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  [4, 5]. Harris group suggests that the neurotoxicity of TSEs can be attributable to enhance ion channel activity of the cells [6-8]. Other studies demonstrate that some PrP mutants decrease the cytoplasmic localization of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  and consequently inhibit their anti-Bax activity [9-11]. Furthermore, the mislocalization and misfolding of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  induce cellular stress which may explain the neurotoxicity in TSEs [23-26]. Some reports suggest that PrP accumulated in the cytoplasm (CyPrP) may represent the toxic species in TSEs [19, 27-29]. Previously, we have demonstrated that CyPrP activates the RNA-dependent protein kinase, PKR, as observed in some prion disease cases [30, 31]. PKR is one of the four kinases that phosphorylates the translation initiation factor  $\text{eIF2}\alpha$  which results in a large reduction of translation initiation and the formation of stress granules (SGs) [32-35]. SGs are ribonucleoprotein particles (RNPs) implicated in mRNA sorting and storage [36-39]. Furthermore, SGs promote cell survival by the sequestration of pro-apoptotic factors. We

have also shown that CyPrP impairs the ability of cells to form SGs and that this abnormal stress response contributes to the susceptibility of the cells to environmental stress [30]. Interestingly, a recent work showed that phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is induced in prion diseases and is implicated in prion toxicity (REF). However, they did not investigate the effect of this phosphorylation on SGs formation.

Although CyPrP is a possible toxic species in TSEs, many studies used an artificial construct and thus its actual implication in prion diseases is still controversial. Heritable prion mutants, which cause autosomal dominant diseases, are a more relevant model to study prion toxicity. Therefore, we selected five familial mutants of PrP<sup>C</sup> representing two of the most frequent phenotypes of human prion diseases, namely Creutzfeldt-Jakob diseases (CJDs) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSSs). Furthermore, we used infected cell model with PrP<sup>Sc</sup> agent. Here, we have shown that familial PrP mutants and PrP<sup>Sc</sup> share some important characteristics that may be involved in neurotoxicity. First, we investigated if similar to CyPrP, familial mutants and PrP<sup>Sc</sup> activate PKR, an eIF2 $\alpha$  stress kinase which inhibit the general protein synthesis via eIF2 $\alpha$  phosphorylation and if alter the assembly of SGs. Second, we looked if CyPrP, familial mutants and infected cells interfere with the assembly of another type of RNA granules, P-bodies. Those constitutive RNPs are involved in mRNA decay and storage, and particularly in miRNA and small interfering RNA (siRNA) activity [35, 40-42] and are essential for cell survival (REF). These characteristics of misfolded PrP to interfere with the assembly of RNA granules may represent an important toxic mechanism in TSEs.

## **Material and method:**

### *Antibodies, clones, and reagents*

Primary antibodies used were polyclonal anti-eiF2 $\alpha$  (FL-135, SantaCruz Biotechnology), monoclonal anti-phospho-eiF2 $\alpha$  Ser51 ( ,Abcam), anti-PKR (clone B-10, SantaCruz Biotechnology), anti-phospho-PKR Thr-446 (clone E120, Abcam), anti-TIAR ( ), anti-DDX6 ( ), anti-Dcp1a, anti-GW182, anti-GW182, anti-AGO2, anti-hnRNPA1, anti-PABP and anti-Dicer. Secondary antibodies were alexa Fluor 488 and 633 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse anti anti-rabbit IgG (Molecular Probes) and peroxydase-linked anti-mouse and anti-rabbit IgG from sheep (Amersham Biosciences).

## **Results:**

### **EXPRESSION OF FAMILIAL MUTANTS OF PrP<sup>C</sup> INDUCES THE PHOSPHORYLATION OF eiF2 $\alpha$ BUT INHIBIT SGs FORMATION.**

In response to diverse environmental stress conditions, eukaryotic cells reduce their protein synthesis by the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  at residue Ser 51 (eiF2 $\alpha$ -P) which also induce the formation of SGs in order to conserve anabolic energy for the repair of stress-induced damage [43][44]. SGs are known to sequestrate pro-apoptotic factors to promote cells survival [45][46][47][48][49]. As mentioned before, several studies demonstrated that cellular stresses were implicated in prion toxicity. In our previous study, we have demonstrated that CyPrP induce the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  via the

activation of PKR, an eiF2 $\alpha$  kinase, [30, 31] but inhibit the assembly of SGs [30]. Here, we determined if the PrP<sup>C</sup> familial mutants associated with Creutzfeldt-Jakob Disease (PrPD178N, E200K), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (PrPP102L, Y145X, Q160X) induce the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  and inhibit SGs formation similar to CyPrP. Therefore, we monitored the phosphorylation level of eiF2 $\alpha$  with antibodies that detect respectively endogenous eiF2 $\alpha$  only when phosphorylated at Ser51 and total eiF2 $\alpha$ . The ratio of eiF2 $\alpha$ -P / total eiF2 $\alpha$  was determined by band density quantification with ImageJ program. Previously, we have demonstrated that PrP<sup>C</sup> overexpression did not affect the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  [30]. Fig 1A shows that, compared to PrP<sup>C</sup>, the expression of all familial mutants tested induce significantly the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  in N2a cells and Hek293 (not shown). The phosphorylation of eiF2 $\alpha$  is confirmed by immunofluorescence (Fig1 B). Normally, phosphorylated eiF2 $\alpha$  is located in SGs, however we observed a higher diffuse level of phosphorylated eiF2 $\alpha$  in cells expressing familial mutants and not a granular staining as expected. Whilst less or no signal was detected in untransfected cells and PrP<sup>C</sup>-transfected cells (Fig1 B). These results propose that familial mutants of PrP<sup>C</sup> increase the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  but inhibit SGs formation.

Four stress kinases can induce the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  at Ser51, named PKR (RNA-dependent protein kinase), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), HRI (Heme-regulated inhibitor) and GCN2 (general control non-derepressible-2) [50][51]. Some studies suggest that PKR are activated in some prion diseases [52][53][54], consequently, we tested if PKR are activated in cells expressing PrP familial mutants. We observed that PrP mutants induce significantly the activation of PKR (Fig 2A) in N2a and

Hek293 cells. The weak induction of PKR activation and eiF2 $\alpha$  phosphorylation by the familial mutants can be explain with the expression level of different proteins and the efficiency of the mutations to induce misfolded PrP proteins because it is known that the mutations did not induce misfolding of all PrP proteins but only a small proportion (REF). Together, these results strongly suggest that familial mutants of PrP<sup>C</sup> induce the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  via PKR activation and inhibit SGs formation.

### **EXPRESSION OF FAMILIAL MUTANTS OF PrP<sup>C</sup> INHIBIT SGs FORMATION FOLLOWING ENVIRONMENTAL STRESS INDEPENDENTLY OF eiF2 $\alpha$ PHOSPHORYLATION LEVEL.**

To confirm that familial mutants inhibit SGs formation similar to CyPrP, we determined if following environmental stress, they can inhibit the assembly of SGs. Firstly, we determined which domain of CyPrP is responsible to inhibit SGs formation, observed in previous study [53]. The formation of SGs was monitored with antibodies directed against TIAR, a protein that co-aggregates with mRNA at mammalian SGs and known to be a SGs marker. Expectedly, in unstressed conditions, TIAR is localized in the cytoplasm and nucleus of N2a cells (not shown). Following heat stress, untransfected N2a cells and N2a cells expressing EGFP, PrP<sup>GFP</sup>, and the N-terminal domain of CyPrP<sup>GFP</sup> relocalized the majority of TIAR protein to SGs (Fig. 3A). In contrast, the expression of CyPrP<sup>GFP</sup> and the C-terminal domain of CyPrP<sup>GFP</sup> inhibited significantly the SGs formation (Fig. 3A). These results indicated that the C-terminal domain of CyPrP

is implicated in SGs inhibition following environmental stress. The same results were obtained in HEK293 cells and in oxidative stress condition (data not shown).

Secondly, we determined if familial mutants of PrP interfere with the assembly of SGs, similar to CyPrP. We used in situ hybridization with oligo-dT probes and confocal microscopy to visualize poly(A) RNA in SGs. N2a cells were transfected with five familial mutants, E200K and D178N representing CJDs and P102L, Y145X and Q160X related to GSSs. PrP<sup>C</sup> and CyPrP<sup>GFP</sup> were used respectively as negative and positive control of SGs inhibition. As expected, cells expressing PrP<sup>C</sup> conserved their capacity to form SGs following heat stress; however, all familial mutants tested inhibited significantly SGs formation similar to CyPrP (Fig. 3B). The same results were obtained in oxidative stress condition and in Hek293 cells (data not shown). The formation of SGs following heat or oxidative stress depends on the phosphorylation eiF2 $\alpha$  at residue Ser51 [43][51][55][56][57][58][43]. Therefore, we tested if the familial mutants affect the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  following these stresses. We monitored the phosphorylation level of eiF2 $\alpha$  with antibodies that detects respectively eiF2 $\alpha$ -P and total eiF2 $\alpha$ . Fig 3C shows that the familial mutants did not affect the phosphorylation of eiF2 $\alpha$  following cellular stress. Together, these results suggest that familial PrP familial mutants inhibit SGs formation independently of eiF2 $\alpha$  phosphorylation. We also investigated the consequence of SGs inhibition on cell survival by XTT assay. Fig 3D shows that cells expressing PrP mutants are significantly more susceptible to cell death that empty vector and PrP<sup>C</sup> overexpression conditions. These results strongly suggest that following environmental stress, PrP familial mutants inhibit SGs formation independently of eiF2 $\alpha$



phosphorylation and could explain the susceptibility of cells to cell death following environmental stress.

### **FAMILIAL PrP MUTANTS INHIBIT P-BODIES FORMATION.**

SGs are known to be closely related with other RNA granules, named P-bodies [59][60][61][62][63][45][64]. Furthermore, recent studies reveal that PrP<sup>C</sup> interact with Ago2 on MVBs structures and increased the association of P-bodies with MVB via probably Ago2 interaction (REF). We confirm by co-immunoprecipitation that PrP<sup>C</sup> interact with Ago2 and a P-bodies component, named DCP1a (Fig. 4A-C). We also show by co-immunoprecipitation that PrP<sup>C</sup> increases the interaction of Ago2 with P-bodies component (Fig. 4D) and that the octarepeat region of PrP<sup>C</sup> is implicated in this association. As PrP mutants inhibit miRNA activity, the localization of GW182 to multivesicular bodies (MVBs) (REF) and SGs formation, we determined if familial PrP mutants and CyPrP affect P-bodies assemblies. P-bodies formation was monitored with an antibodies directed against DDX6, a RNA helicase that specifically resides to P-bodies in unstressed condition. Fig 4E shows that cells expressing PrP mutants and CyPrP have significantly less, smallest or undetectable P-bodies in the cytoplasm of cells compared to untransfected and PrP<sup>C</sup>-transfected cells. We also find a significant augmentation of cells without P-bodies in PrP mutant conditions compared to PrP<sup>C</sup> and untransfected conditions. We monitored by western blots the expression level of two proteins localized in P-bodies, DDX6 and DCP1a in unstressed condition. We find that the inhibition of P-bodies formation was not due to a diminution of DDX6 and DCP1a protein levels (Fig. 4F). We observed the same things in Hek293 cells. Together, these results suggest that

the inhibition of P-bodies assemblies by the PrP mutants and CyPrP is independent to expression level of proteins composed P-bodies.

### **PrP MUTANTS INCREASES siRNA ACTIVITY.**

Several reports suggest that P-bodies are a component of the miRNA and siRNA pathway; however his exact role still controversy [45, 65-82]. Many studies showed that P-bodies is not essential for siRNA activity and suggest that siRNA activity occur more in cytoplasm than the P-bodies (Ref). As PrP mutants inhibit P-bodies assemblies and miRNA activity (Ref), we determined if the familial PrP mutants and cyPrP affect siRNA activity. We monitored the siRNA activity with the luciferase assays. It consists to express Firefly mRNA and transfected siRNA target their 3'UTR or a negative siRNA control (Fig. 6A). The day after; we determined the ratio of luciferase activities (Renilla/Firefly) with luminescence detector. Fig 6B. show that PrP mutants increased significantly siRNA activity compared to PrP<sup>C</sup> and empty vector conditions. We suggest that the induction of siRNA activity by the PrP mutants is probably a consequence of P-bodies inhibition, which increases cytoplasmic pool of Ago2 and consequently siRNA activity.

### **AS FAMILIAL PrP MUTANTS, PrP<sup>Sc</sup> ALTERED SGs AND P-BODIES ASSEMBLIES.**

As TSEs is infectious neurodegenerative disorders, we test if cells infected with PrP<sup>Sc</sup> agent can induce eiF2 $\alpha$  phosphorylation, SGs and P-bodies formation. Phosphorylation of eiF2 $\alpha$  and SGs formation is visualized by immunofluorescence

against eiF2a(Ser51)-P and SGs are confirmed with an antibody against TIAR. Fig XX show that infection by PrP<sup>Sc</sup> induced eiF2 $\alpha$  phosphorylation but not SGs formation. To confirm that PrP<sup>Sc</sup> inhibit SGs formation we tested if cells infected by PrP<sup>Sc</sup> can form SGs following cellular stress as thermal and oxidative stress. Fig XX demonstrate that infection by PrP<sup>Sc</sup> induce cellular stress but inhibit SGs formation as familial mutants. P-bodies formation was monitored with antibodies directed against DDX6 and Dcp1a, decapping enzyme that specifically resides to P-bodies. Fig XX show that P-bodies formation is inhibited by PrP<sup>Sc</sup> as familial mutants. Together these results demonstrate that PrP<sup>Sc</sup> as familial mutants induce cellular stress but inhibit the formation of two RNA granules, SGs and P-bodies, which are essential to maintain cells survival.

### **CyPrP SEQUESTER IMPORTANT PROTEIN LOCALIZED NORMALLY IN P-BODIES AND SGs.**

As mentioned previously, the accumulation of PrP in the cytoplasm (CyPrP) may represent the toxic species. It is well known that the expression of CyPrP form spontaneously protein aggregates which eventually concentrate at the centrosome and form an aggresome entity. We investigated if the formation of cytosolic PrP aggresome can sequestered some important proteins associated to SGs and/or P-bodies. We visualized by immunofluorescence the localization of hnRNPA1 and PABP1 proteins related to SGs and the GW182 and Dcp1a proteins associated with P-bodies. We observed that the PrP aggresome sequestered partially or completely the hnRNPA1, PABP1, GW182 and Dcp1a proteins but not Dicer protein (Fig. 7). These results demonstrated that PrP aggresome sequestered some specific proteins associated with

RNA granules and this sequestration can explain the inhibition of SGs and P-bodies formation observed below.

## **Discussion**

In this study, we have tested the hypothesis that familial PrP mutants induce a deficient stress response similar to CyPrP. Our results demonstrate that familial PrP mutants provoke a PKR-mediated cellular stress response characterized by the phosphorylation of eiF2 $\alpha$ . However the stress response is only partial since cells do not assemble SGs. In addition, we found that P-bodies, others RNA granules closely associated to SGs, are also inhibited by PrP mutants. The incapacity of cell expressing PrP mutants to form P-bodies have the consequence to decrease miRNA and favor siRNA activity. Furthermore, we observe that cells infected by PrP<sup>Sc</sup> are unable to form SGs and P-bodies which increase the susceptibility of cells to death. Finally, we found that CyPrP sequestered several proteins related to SGs and P-bodies, which can explain the inhibition of these RNA granules.

## ***FAMILIAL PrP MUTANTS AND PKR-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF EIF2 $\alpha$***

Our results reveal that familial PrP mutants induce slightly a PKR-mediated phosphorylation of eiF2 $\alpha$ . Interestingly, it has been showed that in some prion cases, the level of activating-PKR and phosphorylation of eiF2 $\alpha$  are increased [52][53][54]. It is known that the increased of phospho-eiF2 $\alpha$  levels attenuates protein synthesis [43][44], and may be considered as a protective mechanism aiming at diminishing the load of

newly synthesized unfolded PrP. However, constitutive activation of PKR and phosphorylation of eiF2 $\alpha$  are likely to result in cell death [100][101][102, 103][104][105][106] (REF Alzheimer). It will be important to address the mechanism of activation of PKR. Interestingly, several reports demonstrated a higher level of endogenous retrovirus and retrotransposons activity in prion diseases [107][108, 109][110][111][112][113][114][115, 116][117, 118][119]. It is well known that endogenous retrovirus and retrotransposons are long dsRNA which could potentially activate PKR. Interestingly, the reactivation of this endogenous retrovirus is known to cause neuropathology which is similar to prion-induced spongiosis. This reactivation is related to a diminution of PrP<sup>C</sup> expression [120][121][122]. Furthermore, it is known that P-bodies inhibit the reactivation of retrovirus and retrotransposons [123][124][125][126][127, 128]. It would be interesting to investigate the implication of endogenous retrovirus and retrotransposon activities in the activation of PKR and the implication of P-bodies inhibition in this event.

Several studies suggest a relationship between phosphorylation of eiF2 $\alpha$  and PKR activation with neurodegeneration observed in Alzheimer's disease [129] [130][131][132][133][134-137][138], Huntington's disease [139] [140], Parkinson's disease [140] and prion's disease. However, some studies reveal that no significant phosphorylation of eiF2 $\alpha$  in the brain of patients deceased from prion disease [141]. It is possible that phosphorylation of eiF2 $\alpha$  occurs in the early stages of the disease only. Time-course studies are possible in animal models of prion diseases and may answer this question.

***FAMILIAL PrP MUTANTS AND PrP<sup>Sc</sup> INHIBIT THE FORMATION OF TWO RNA GRANULES, SGs AND P-BODIES.***

The major finding of the present work relates to inhibition of two critical RNA granules, SGs and P-bodies, which are essential to the cell homeostasis during cellular stress condition and also physiological condition for P-bodies. SGs are known to be a site of mRNA triage and to sequester pro-apoptotic factor. Consequently, SGs assemblies promote cell survival during cellular stress (REF). Cells expressing familial PrP mutants and CyPrP can neither assemble SGs independently of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Interestingly, it is well known that several stresses including proteasome, oxidative and ER stress are implicated in prion diseases (REF). We suggest that inhibition of SGs during cellular stress release the pro-apoptotic factor and increase sensitivity of the cells to environmental stress.

Recent reports showed that PrP<sup>C</sup> interact with RISC, specially Ago and that PrP<sup>C</sup> increases the association of P-bodies with MVBs. Here, we show that PrP<sup>C</sup> increases the association of Ago-2 with P-bodies. Furthermore, we propose that PrP mutants destabilize RISC and subsequently P-bodies formation. In addition, P-bodies are known to inhibit the activity of endogenous retrovirus and retrotransposon (REF). Interestingly, some studies observed an augmentation of endogenous retrovirus and retrotransposons activities in prion diseases (REF). It would be interesting to investigate if this augmentation of endogenous retrovirus and retrotransposon activities is a consequence of P-bodies inhibition.

The inhibition of these two RNA granules would result in enhanced cell vulnerability and/or premature neurodegeneration. Furthermore, some studies suggested an implication of SGs and P-bodies in several neurodegenerative diseases as Huntington, Alzheimer, SCA, ... (REF). As mentioned previously, several studies demonstrated that eIF2 $\alpha$  kinase such as PKR, are implicated in the neurodegeneration process of several neurodegenerative disease. However, these studies did not investigate the implication of SGs and P-bodies formation in the pathologies. It will be interesting to investigate this hypothesis in several neurodegeneration diseases such Alzheimer and Parkinson diseases.

***IN CONTRAST TO PrP<sup>C</sup>, FAMILIAL MUTANTS INDUCE siRNA ACTIVITY.***

P-bodies are implicated in the mRNA homeostasis, particularly in miRNA and siRNA pathways. Surprisingly, we found that PrP<sup>C</sup> interact with AGO2 and GW182 proteins, two core proteins of RISC complex, and this interaction occur in the cytoplasm and the MVBs. Interestingly, the N-terminal region of PrP<sup>C</sup> contains five GW/WG motifs known to be responsible of the interaction between GW182 and AGO proteins (REF). Furthermore, the Voinnet group's demonstrated that PrP and GW182 proteins colocalized in endosomes and MVBs (REF). Another report demonstrated in vitro the interaction of PrP<sup>C</sup> with AGO proteins (REF). We suggest that PrP<sup>C</sup> interact with the core of RISC complex via these GW/WG motifs. The consequence of this interaction is the inhibition of miRNA and siRNA activities without affecting miRNA maturation. We propose that PrP act as a negative regulator of miRNA and siRNA activities. Furthermore, we suggest

that the familial PrP mutants lost this newly function of PrP<sup>C</sup> which is according with the hypothesis of lost functions of familial PrP mutants. However, we propose that by an alternative mechanism implicated an alteration of P-bodies assemblies and MVBs maturation (discuss below); the familial PrP mutants inhibit miRNA activity without affecting miRNA processing.

Interestingly, several reports suggest a link between deregulation of miRNA pathways and the neurodegeneration in Alzheimer's disease and prion's disease. They suggested that miRNAs are effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration (REF). Here we propose that the deregulation of miRNA and siRNA pathways by different mechanisms is responsible of neurodegeneration observed in prion disease. However, the majority of these studies worked on miRNA which the processing are affected. Here, we show that the miRNA activity can be affected without default in their maturation.



1. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
2. Hetz, C. and C. Soto, *Protein misfolding and disease: the case of prion disorders*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(1): p. 133-43.
3. Castilla, J., et al., *In vitro generation of infectious scrapie prions*. Cell, 2005. **121**(2): p. 195-206.
4. Mallucci, G., et al., *Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis*. Science, 2003. **302**(5646): p. 871-4.
5. Brandner, S., et al., *Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 339-43.
6. Solomon, I.H., J.E. Huettner, and D.A. Harris, *Neurotoxic mutants of the prion protein induce spontaneous ionic currents in cultured cells*. J Biol Chem. **285**(34): p. 26719-26.
7. Solomon, I.H., et al., *An N-terminal polybasic domain and cell surface localization are required for mutant prion protein toxicity*. J Biol Chem. **286**(16): p. 14724-36.
8. Westergard, L., J.A. Turnbaugh, and D.A. Harris, *A nine amino Acid domain is essential for mutant prion protein toxicity*. J Neurosci. **31**(39): p. 14005-17.
9. Jodoin, J., et al., *Defective retrotranslocation causes loss of anti-Bax function in human familial prion protein mutants*. J Neurosci, 2007. **27**(19): p. 5081-91.
10. Jodoin, J., et al., *Loss of anti-Bax function in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome-associated prion protein mutants*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6647.
11. Lin, D.T., et al., *Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(10): p. 2001-12.
12. Ashok, A. and R.S. Hegde, *Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000479.
13. Harris, D.A., *Trafficking, turnover and membrane topology of PrP*. Br Med Bull, 2003. **66**: p. 71-85.
14. Massignan, T., et al., *A novel, drug-based, cellular assay for the activity of neurotoxic mutants of the prion protein*. J Biol Chem. **285**(10): p. 7752-65.
15. Campana, V., et al., *Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 3): p. 433-42.
16. Wang, X., et al., *Familial CJD associated PrP mutants within transmembrane region induced Ctm-PrP retention in ER and triggered apoptosis by ER stress in SH-SY5Y cells*. PLoS One. **6**(1): p. e14602.
17. Rodriguez, M.M., et al., *A novel mutation (G114V) in the prion protein gene in a family with inherited prion disease*. Neurology, 2005. **64**(8): p. 1455-7.
18. Mishra, R.S., et al., *Cell surface accumulation of a truncated transmembrane prion protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease P102L*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24554-61.
19. Chakrabarti, O. and R.S. Hegde, *Functional depletion of mahogunin by cytosolically exposed prion protein contributes to neurodegeneration*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1136-47.

20. Zanusso, G., et al., *Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23396-404.
21. Hachiya, N.S., et al., *Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(3): p. 894-9.
22. Heske, J., et al., *The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5435-43.
23. Soto, C., *Endoplasmic reticulum stress, PrP trafficking, and neurodegeneration*. Dev Cell, 2008. **15**(3): p. 339-41.
24. Torres, M., et al., *Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress*. PLoS One. **5**(12): p. e15658.
25. Torres, M., et al., *Abnormal calcium homeostasis and protein folding stress at the ER: A common factor in familial and infectious prion disorders*. Commun Integr Biol. **4**(3): p. 258-61.
26. Nunziante, M., et al., *Proteasomal Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress Enhance Trafficking of Prion Protein Aggregates through the Secretory Pathway and Increase Accumulation of Pathologic Prion Protein*. J Biol Chem. **286**(39): p. 33942-53.
27. Mishra, R.S., et al., *Aggresome formation by mutant prion proteins: the unfolding role of proteasomes in familial prion disorders*. J Alzheimers Dis, 2003. **5**(1): p. 15-23.
28. Ma, J., R. Wollmann, and S. Lindquist, *Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol*. Science, 2002. **298**(5599): p. 1781-5.
29. Kristiansen, M., et al., *Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38851-61.
30. Goggin, K., et al., *Prion protein aggresomes are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(3): p. 479-91.
31. Paquet, C., et al., *Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(2): p. 190-8.
32. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 803-8.
33. Holcik, M. and N. Sonenberg, *Translational control in stress and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 318-27.
34. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. Cell Signal. **23**(2): p. 324-34.
35. Moser, J.J. and M.J. Fritzler, *Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies*. Int J Biochem Cell Biol. **42**(6): p. 828-43.
36. Detzer, A., et al., *Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells*. Nucleic Acids Res. **39**(7): p. 2727-41.
37. Leung, A.K., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18125-30.

38. Wu, C., et al., *Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through post-translational modification of Argonaute2*. Mol Cell Biol.
39. Pare, J.M., et al., *Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(14): p. 3273-84.
40. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 9-22.
41. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
42. Jakymiw, A., et al., *The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 8): p. 1317-23.
43. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stressful initiations*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 16): p. 3227-34.
44. Anderson, P. and N. Kedersha, *Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(2): p. 213-21.
45. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. Cell Signal. **23**(2): p. 324-34.
46. Buchan, J.R. and R. Parker, *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. Mol Cell, 2009. **36**(6): p. 932-41.
47. Eisinger-Mathason, T.S., et al., *Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival*. Mol Cell, 2008. **31**(5): p. 722-36.
48. Arimoto, K., et al., *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1324-32.
49. Tsai, N.P. and L.N. Wei, *RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis*. Cell Signal. **22**(4): p. 668-75.
50. Lackner, D.H. and J. Bahler, *Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes*. Int Rev Cell Mol Biol, 2008. **271**: p. 199-251.
51. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
52. Paquet, C., et al., *Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(2): p. 190-8.
53. Goggin, K., et al., *Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(3): p. 479-91.
54. Roffe, M., et al., *Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(29): p. 13147-52.
55. Kedersha, N., et al., *Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): p. 195-210.
56. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 803-8.
57. Kedersha, N.L., et al., *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1431-42.

58. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
59. Buchan, J.R., T. Nissan, and R. Parker, *Analyzing P-bodies and stress granules in Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. **470**: p. 619-40.
60. Pare, J.M., et al., *Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(14): p. 3273-84.
61. Goodier, J.L., et al., *LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(18): p. 6469-83.
62. Buchan, J.R., D. Muhlrud, and R. Parker, *P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2008. **183**(3): p. 441-55.
63. Balagopal, V. and R. Parker, *Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(3): p. 403-8.
64. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(6): p. 871-84.
65. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(6): p. 633-6.
66. Rehwinkel, J., et al., *A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing*. *Rna*, 2005. **11**(11): p. 1640-7.
67. Moser, J.J. and M.J. Fritzler, *Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies*. *Int J Biochem Cell Biol*. **42**(6): p. 828-43.
68. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
69. Jakymiw, A., et al., *Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(12): p. 1267-74.
70. Pauley, K.M., et al., *Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(9): p. 904-10.
71. Lian, S., et al., *GW bodies, microRNAs and the cell cycle*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(3): p. 242-5.
72. Serman, A., et al., *GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(14): p. 4715-27.
73. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(7): p. 719-23.
74. Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, and E. Izaurralde, *MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006. **71**: p. 523-30.
75. Kulkarni, M., S. Ozgur, and G. Stoecklin, *On track with P-bodies*. *Biochem Soc Trans*. **38**(Pt 1): p. 242-51.
76. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. *Mol Cell*, 2007. **25**(5): p. 635-46.
77. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 9-22.
78. Eulalio, A., et al., *P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(11): p. 3970-81.

79. Zeitelhofer, M., P. Macchi, and R. Dahm, *Perplexing bodies: The putative roles of P-bodies in neurons*. RNA Biol, 2008. **5**(4): p. 244-8.
80. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. Rna, 2005. **11**(4): p. 371-82.
81. Jakymiw, A., et al., *The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 8): p. 1317-23.
82. Sheth, U. and R. Parker, *Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1095-109.
83. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
84. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
85. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
86. Paroo, Z., Q. Liu, and X. Wang, *Biochemical mechanisms of the RNA-induced silencing complex*. Cell Res, 2007. **17**(3): p. 187-94.
87. Yoda, M., et al., *ATP-dependent human RISC assembly pathways*. Nat Struct Mol Biol. **17**(1): p. 17-23.
88. Miyoshi, K., et al., *Biochemical analyzes of endogenous argonaute complexes immunopurified with anti-Argonaute monoclonal antibodies*. Methods Mol Biol. **725**: p. 29-43.
89. Miyoshi, K., et al., *Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the Drosophila miRNA pathway*. Rna, 2009. **15**(7): p. 1282-91.
90. van den Berg, A., J. Mols, and J. Han, *RISC-target interaction: cleavage and translational suppression*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1779**(11): p. 668-77.
91. Jabri, E., *P-bodies take a RISC*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(7): p. 564.
92. Rossi, J.J., *RNAi and the P-body connection*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 643-4.
93. Leung, A.K., J.M. Calabrese, and P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18125-30.
94. Detzer, A., et al., *Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells*. Nucleic Acids Res. **39**(7): p. 2727-41.
95. Didiot, M.C., et al., *Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 428-37.
96. Nonhoff, U., et al., *Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1385-96.
97. Gibbings, D. and O. Voinnet, *Control of RNA silencing and localization by endolysosomes*. Trends Cell Biol. **20**(8): p. 491-501.
98. Gibbings, D.J., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1143-9.

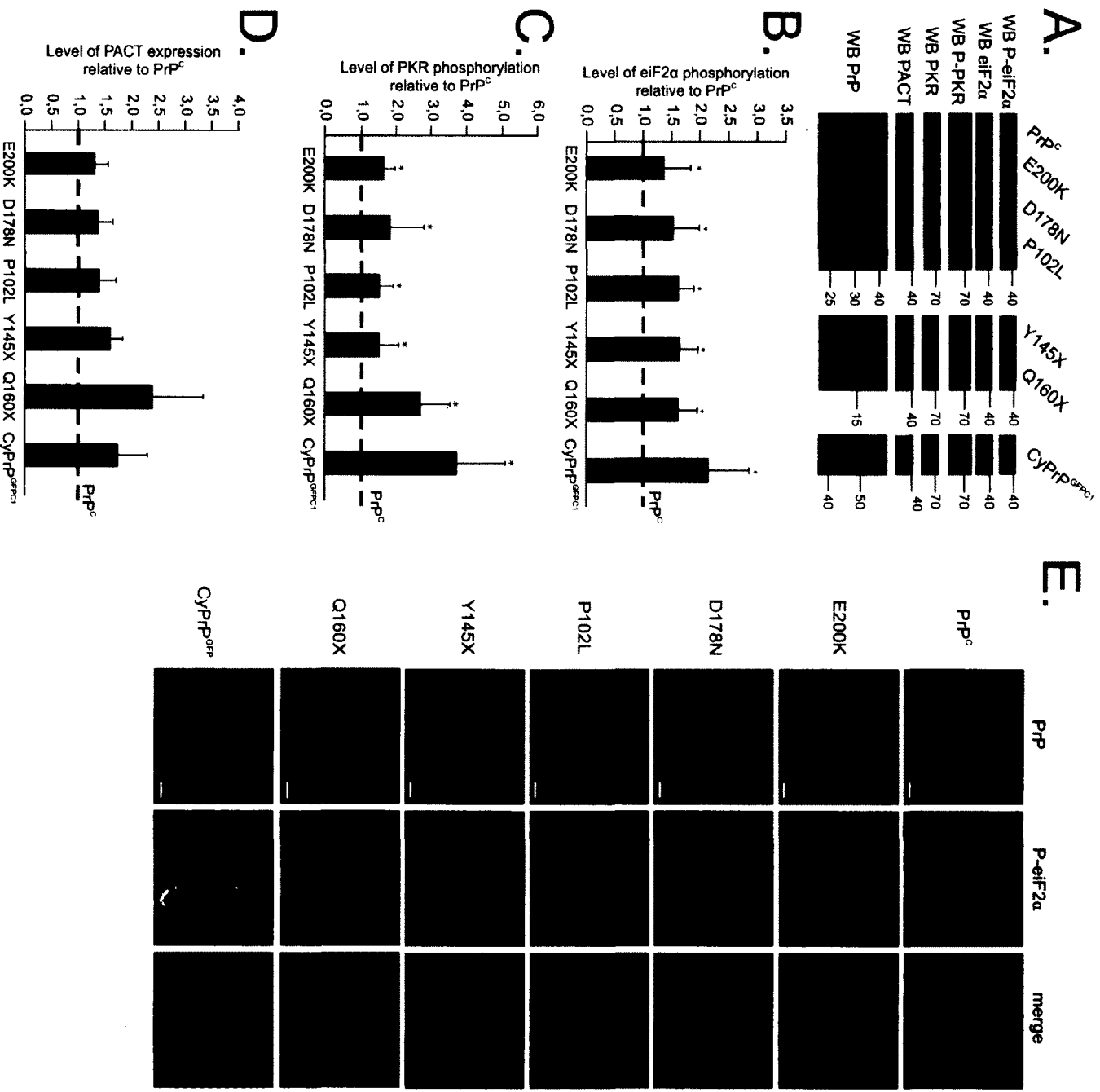
99. Siomi, H. and M.C. Siomi, *RISC hitchhikes onto endosome trafficking*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1049-51.
100. Srivastava, S.P., K.U. Kumar, and R.J. Kaufman, *Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2416-23.
101. Scheuner, D., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21458-68.
102. Kalai, M., et al., *The caspase-generated fragments of PKR cooperate to activate full-length PKR and inhibit translation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1050-9.
103. Saelens, X., M. Kalai, and P. Vandenabeele, *Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41620-8.
104. Chang, R.C., et al., *Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration*. J Neurochem, 2002. **83**(5): p. 1215-25.
105. Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban, *Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4653-63.
106. Marissen, W.E., et al., *Identification of caspase 3-mediated cleavage and functional alteration of eukaryotic initiation factor 2alpha in apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9314-23.
107. Greenwood, A.D., et al., *Bovine spongiform encephalopathy infection alters endogenous retrovirus expression in distinct brain regions of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis)*. Mol Neurodegener. **6**(1): p. 44.
108. Jeong, B.H., et al., *The prevalence of human endogenous retroviruses in cerebrospinal fluids from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. J Clin Virol. **47**(2): p. 136-42.
109. Lee, K.H., et al., *Scrapie infection activates the replication of ecotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia virus (MuLV) in brains and spinal cords of senescence-accelerated mice: implication of MuLV in progression of scrapie pathogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(1): p. 122-30.
110. Lotscher, M., et al., *Induced prion protein controls immune-activated retroviruses in the mouse spleen*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1158.
111. Stengel, A., et al., *Prion infection influences murine endogenous retrovirus expression in neuronal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(3): p. 825-31.
112. Jeong, B.H., et al., *Analysis of the expression of endogenous murine leukemia viruses in the brains of senescence-accelerated mice (SAMP8) and the relationship between expression and brain histopathology*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(11): p. 1001-12.
113. Carp, R.I., et al., *An endogenous retrovirus and exogenous scrapie in a mouse model of aging*. Trends Microbiol, 2000. **8**(1): p. 39-42.

114. Carp, R.I., et al., *Scrapie strain-specific interactions with endogenous murine leukaemia virus*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 1): p. 5-10.
115. Akowitz, A., T. Sklaviadis, and L. Manuelidis, *Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 1101-7.
116. Manuelidis, L., et al., *Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5124-8.
117. Kiesel, P., et al., *Possible editing of Alu transcripts in blood cells of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)*. J Toxicol Environ Health A. **74**(2-4): p. 88-95.
118. Kiesel, P., et al., *Transcription of Alu DNA elements in blood cells of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)*. Prion. **4**(2): p. 87-93.
119. Kim, B.H., et al., *Physiological properties of astroglial cell lines derived from mice with high (SAMP8) and low (SAMR1, ICR) levels of endogenous retrovirus*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 104.
120. Szurek, P.F., et al., *Identification of point mutations in the envelope gene of Moloney murine leukemia virus TB temperature-sensitive paralytogenic mutant ts1: molecular determinants for neurovirulence*. J Virol, 1988. **62**(1): p. 357-60.
121. Jolicoeur, P., G. Masse, and D.G. Kay, *The prion protein gene is dispensable for the development of spongiform myeloencephalopathy induced by the neurovirulent Cas-Br-E murine leukemia virus*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 9031-4.
122. Munk, C., et al., *10A1-MuLV but not the related amphotropic 4070A MuLV is highly neurovirulent: importance of sequences upstream of the structural Gag coding region*. Virology, 2003. **313**(1): p. 44-55.
123. Lu, C., X. Contreras, and B.M. Peterlin, *P bodies inhibit retrotransposition of endogenous intracisternal a particles*. J Virol. **85**(13): p. 6244-51.
124. Beliakova-Bethell, N., et al., *Virus-like particles of the Ty3 retrotransposon assemble in association with P-body components*. Rna, 2006. **12**(1): p. 94-101.
125. Checkley, M.A., et al., *P-body components are required for Ty1 retrotransposition during assembly of retrotransposition-competent virus-like particles*. Mol Cell Biol. **30**(2): p. 382-98.
126. Nathans, R., et al., *Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions*. Mol Cell, 2009. **34**(6): p. 696-709.
127. Beckham, C.J., et al., *Interactions between brome mosaic virus RNAs and cytoplasmic processing bodies*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9759-68.
128. Beckham, C.J. and R. Parker, *P bodies, stress granules, and viral life cycles*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 206-12.
129. Peel, A.L. and D.E. Bredesen, *Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice*. Neurobiol Dis, 2003. **14**(1): p. 52-62.
130. Suen, K.C., et al., *Upstream signaling pathways leading to the activation of double-stranded RNA-dependent serine/threonine protein kinase in beta-amyloid peptide neurotoxicity*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49819-27.
131. Onuki, R., et al., *An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease*. Embo J, 2004. **23**(4): p. 959-68.

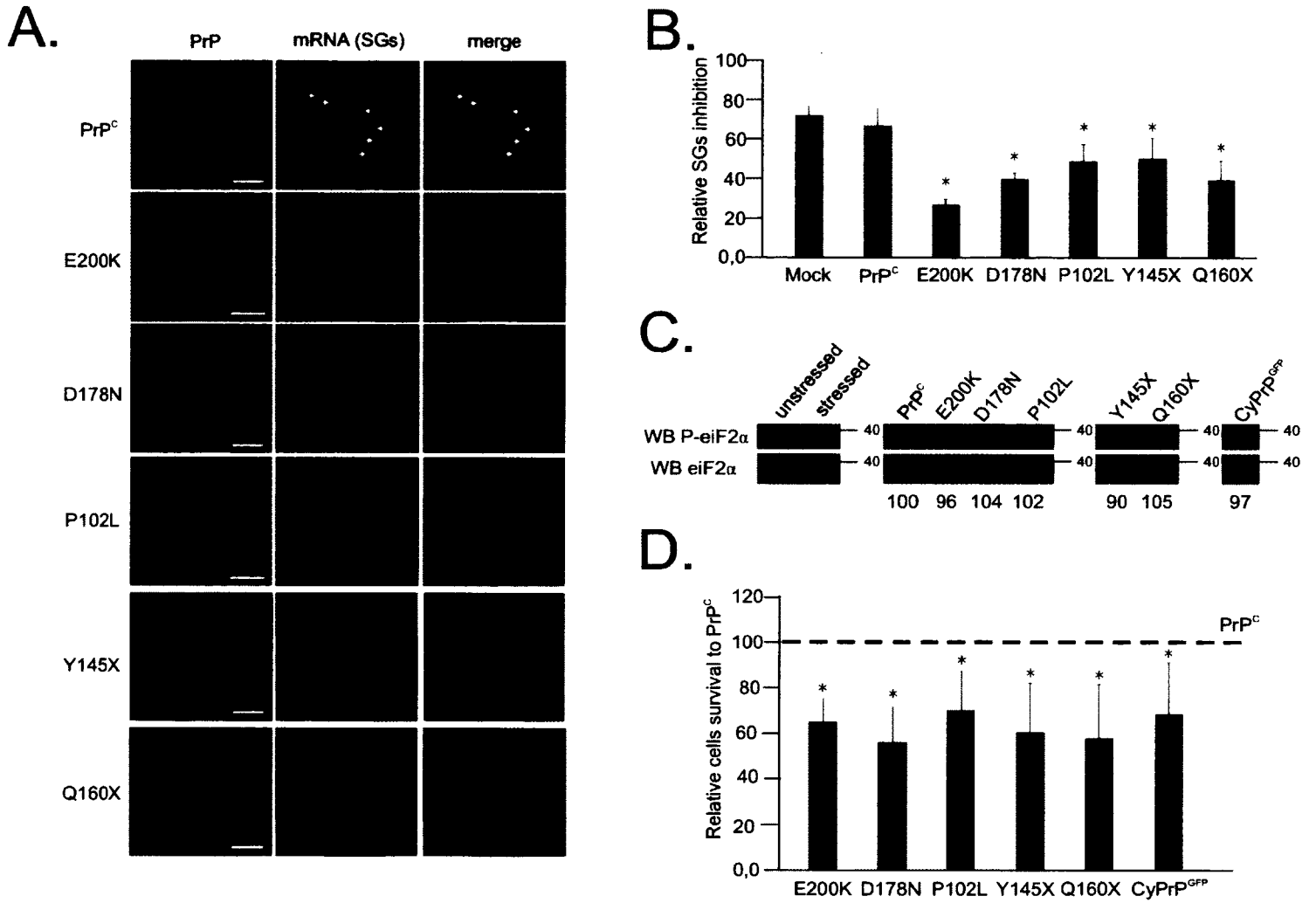
132. Bose, A., et al., *Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease*. Brain Pathol. **21**(2): p. 189-200.
133. Ill-Raga, G., et al., *Activation of PKR causes amyloid ss-peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression*. PLoS One. **6**(6): p. e21456.
134. Couturier, J., et al., *Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (Abeta)-treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice*. J Biol Chem. **285**(2): p. 1272-82.
135. Couturier, J., et al., *Prevention of the beta-amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures*. J Neuroinflammation. **8**: p. 72.
136. Couturier, J., et al., *Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. **21**(4): p. 1217-31.
137. Morel, M., et al., *Evidence of molecular links between PKR and mTOR signalling pathways in Abeta neurotoxicity: role of p53, Redd1 and TSC2*. Neurobiol Dis, 2009. **36**(1): p. 151-61.
138. Bullido, M.J., et al., *Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(8): p. 1160-6.
139. Peel, A.L., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, binds preferentially to Huntington's disease (HD) transcripts and is activated in HD tissue*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(15): p. 1531-8.
140. Bando, Y., et al., *Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease*. Neurochem Int, 2005. **46**(1): p. 11-8.
141. Unterberger, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 348-57.



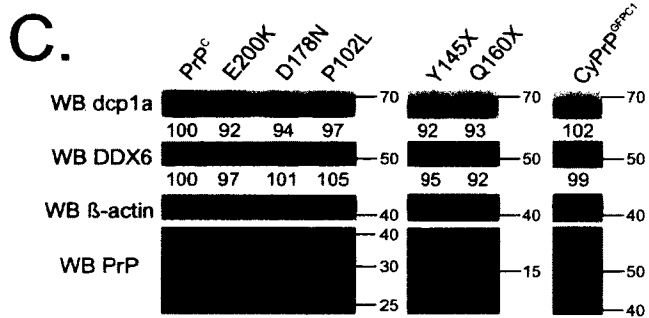
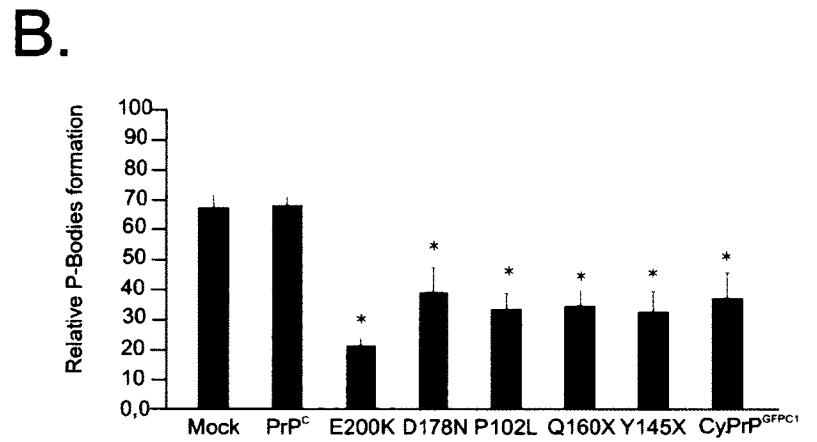
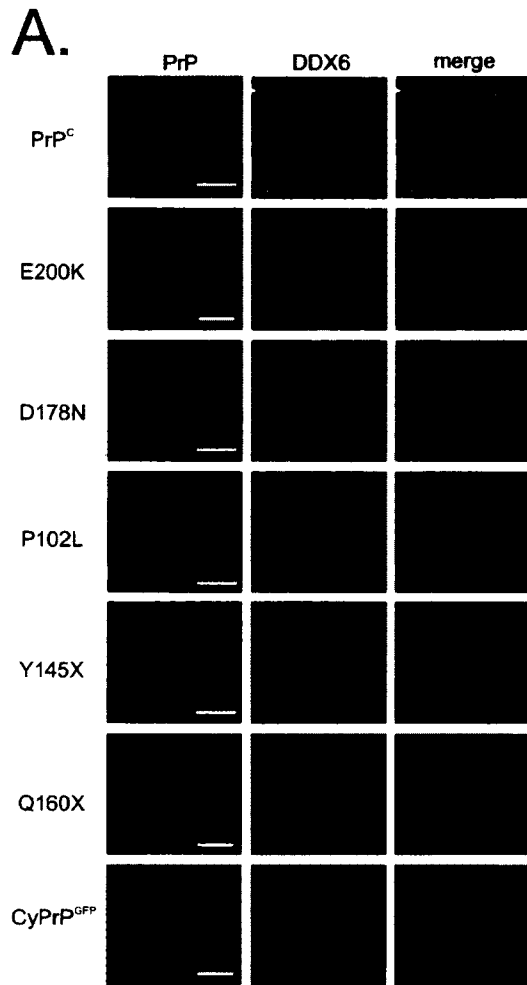
# Figure 1



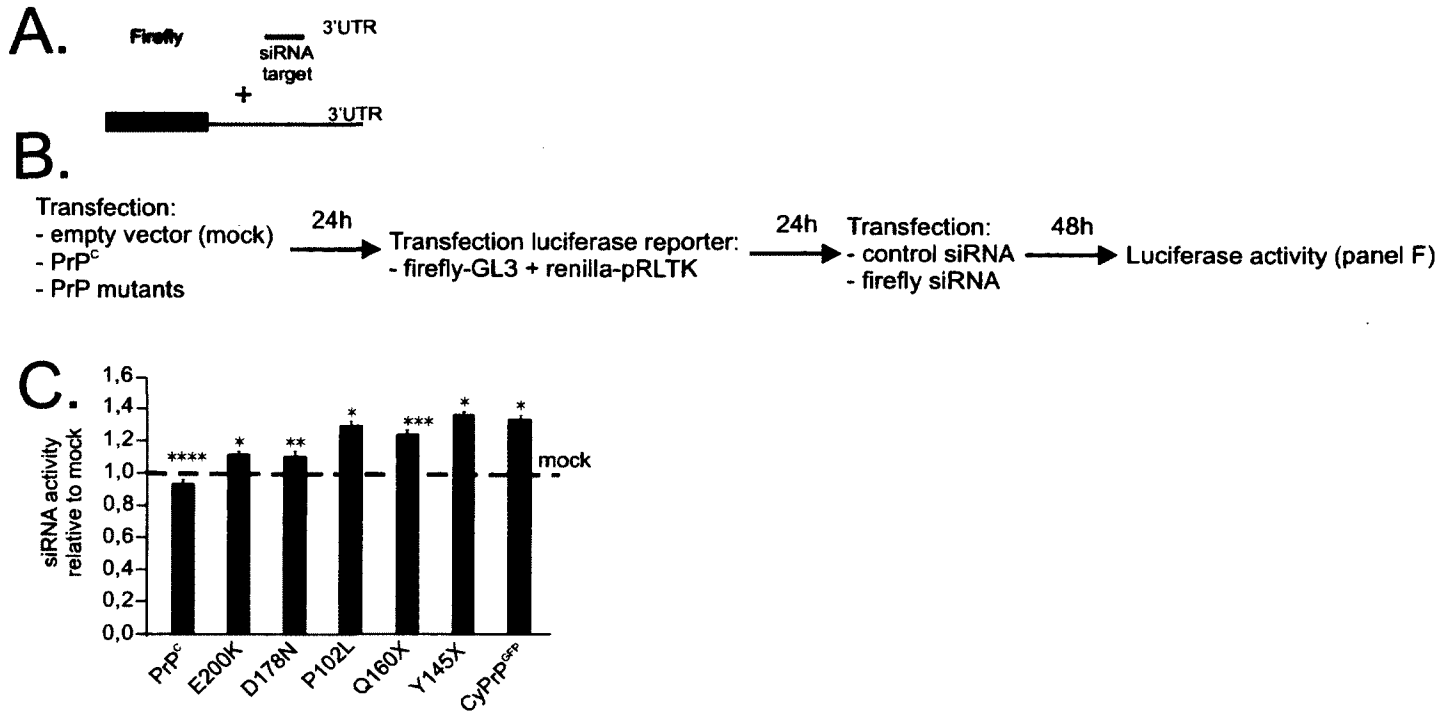
# Figure 2



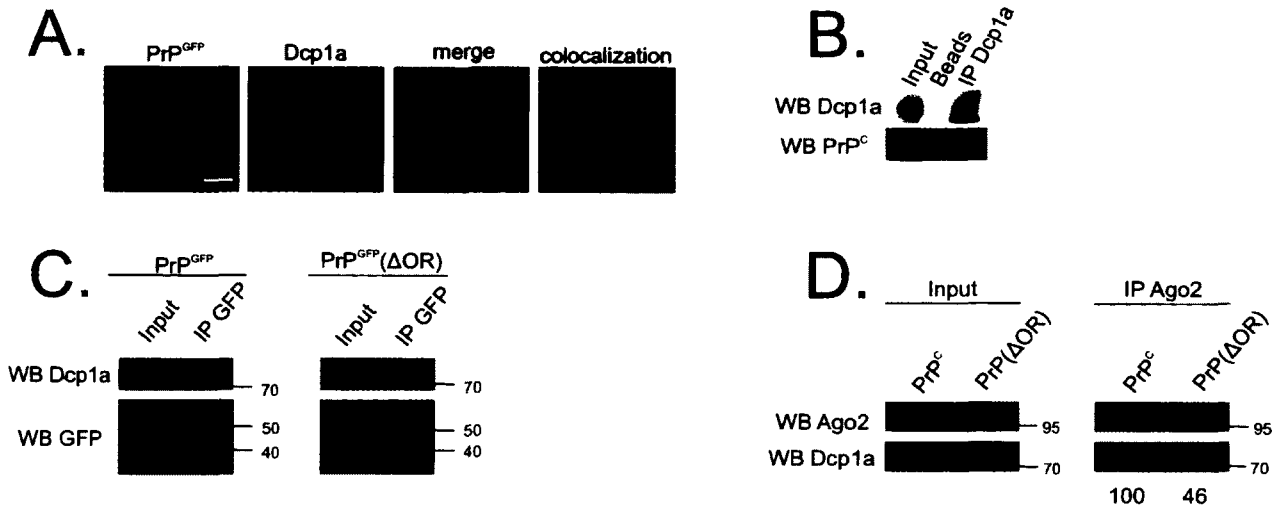
# Figure 3



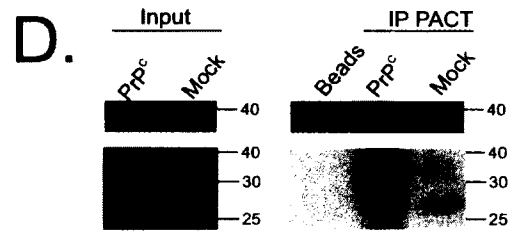
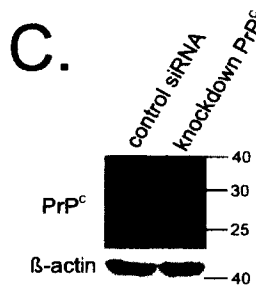
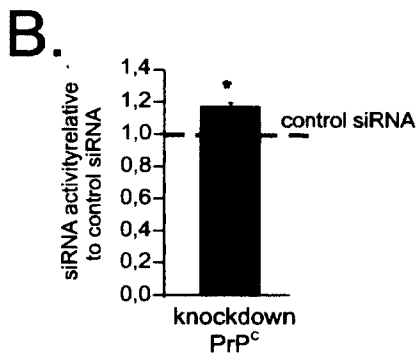
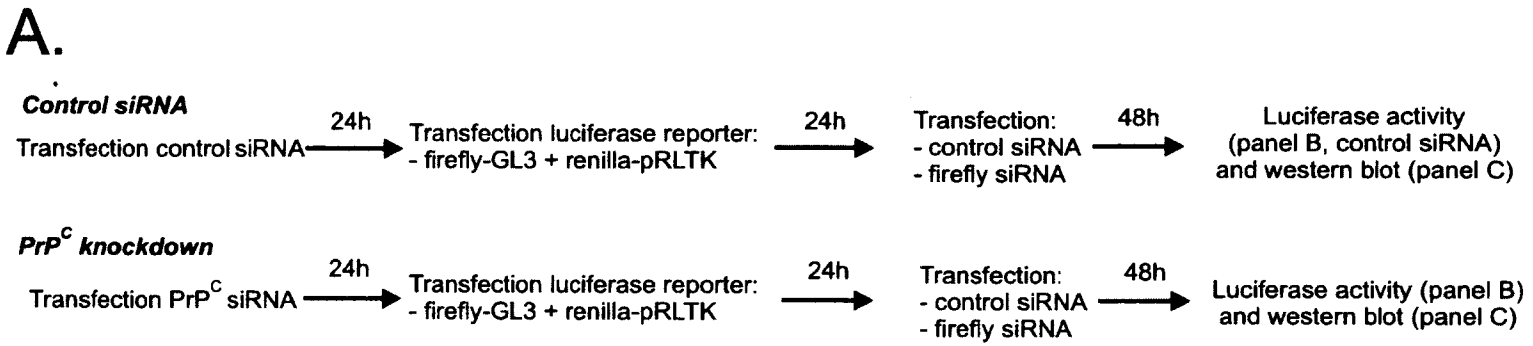
# Figure 4



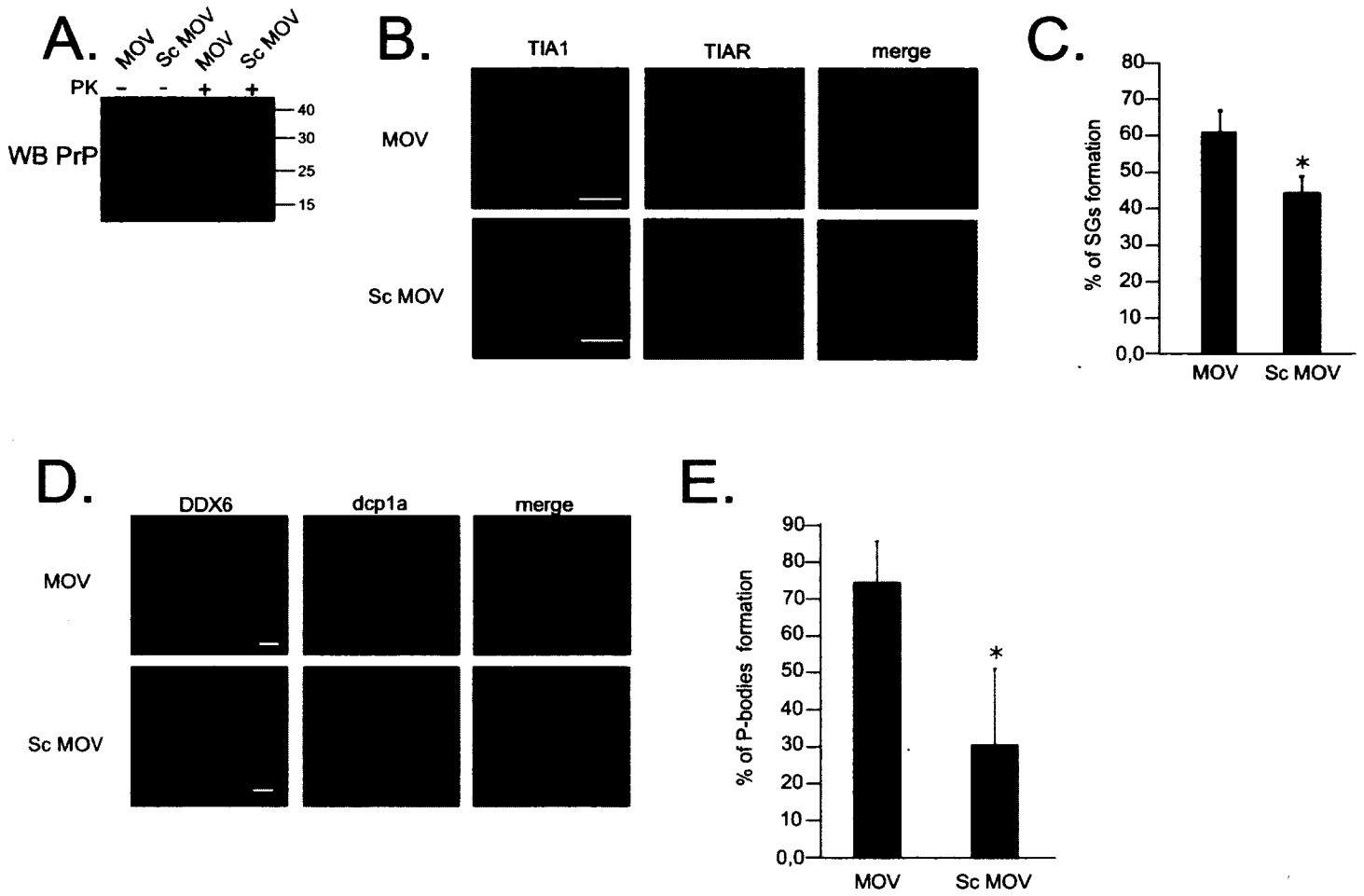
# Figure 4



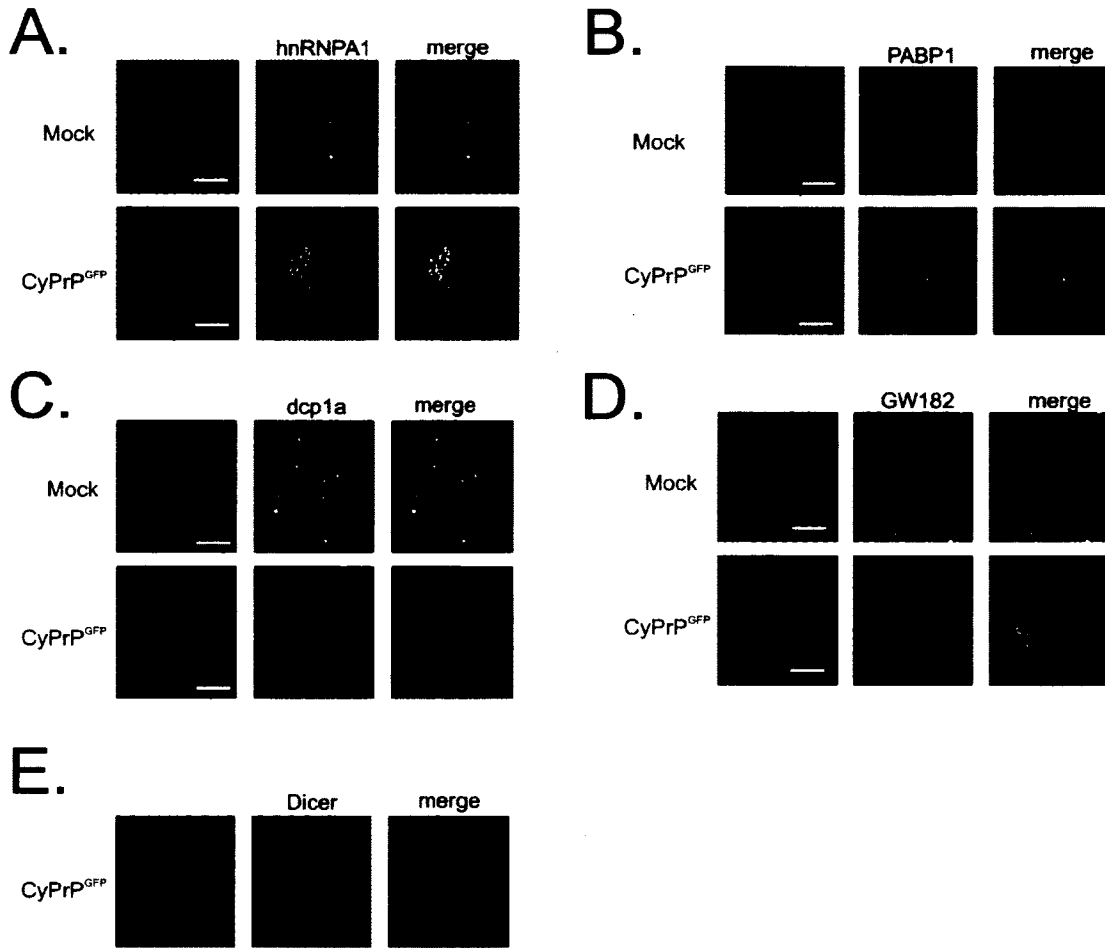
# Figure 5



# Figure 6

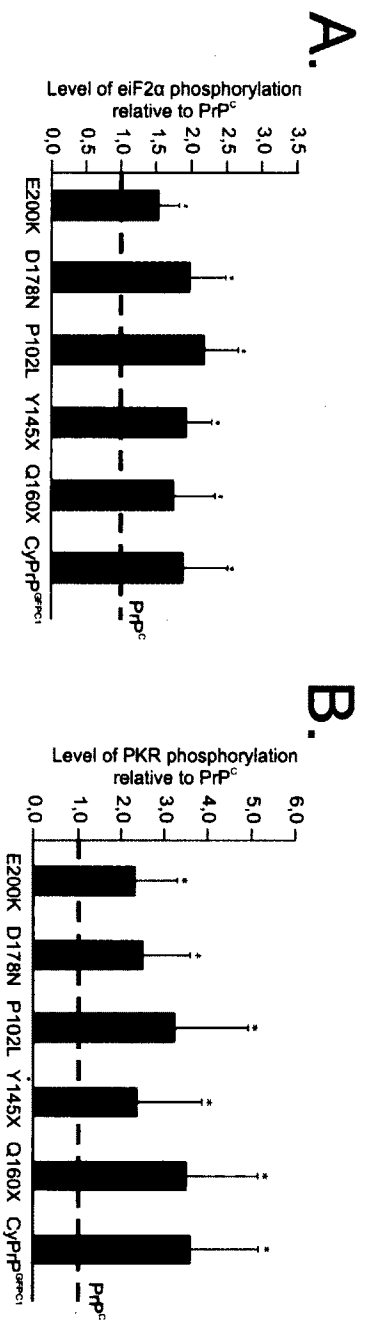


# Figure 7

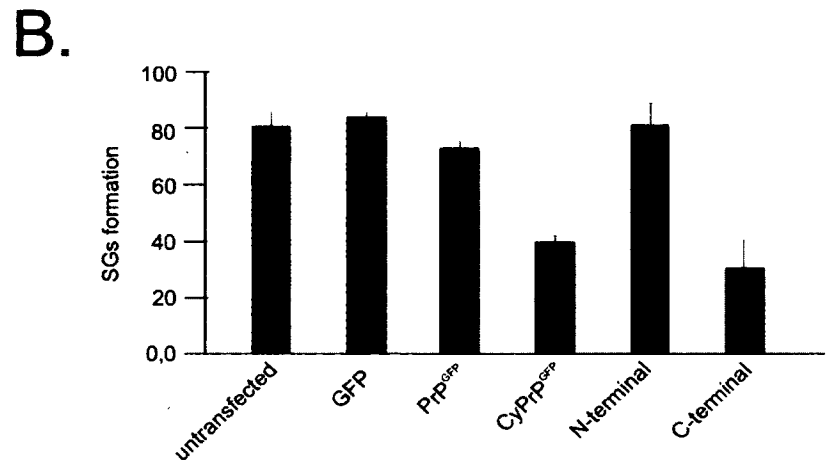
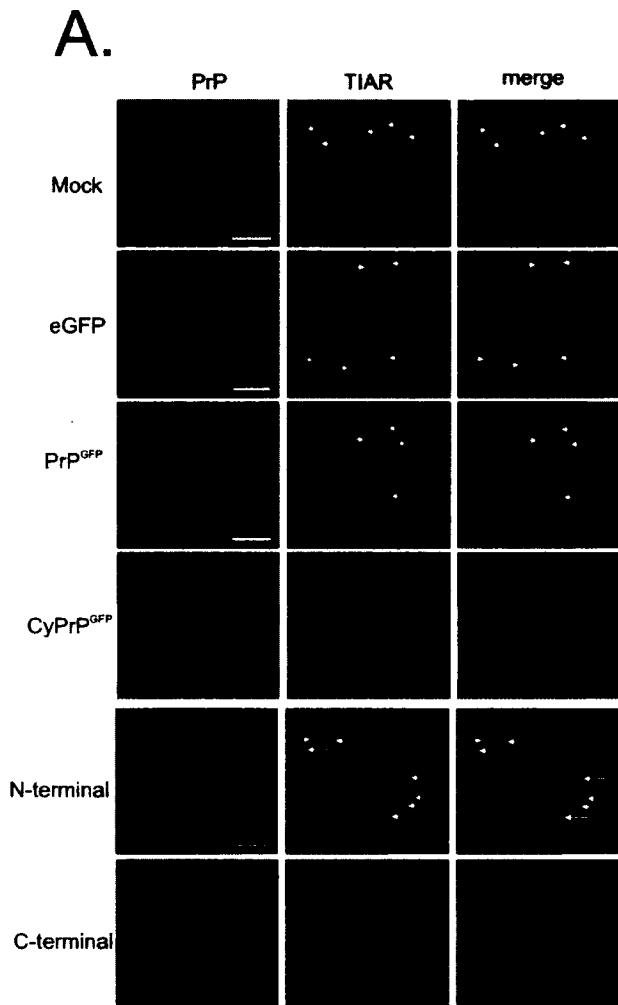




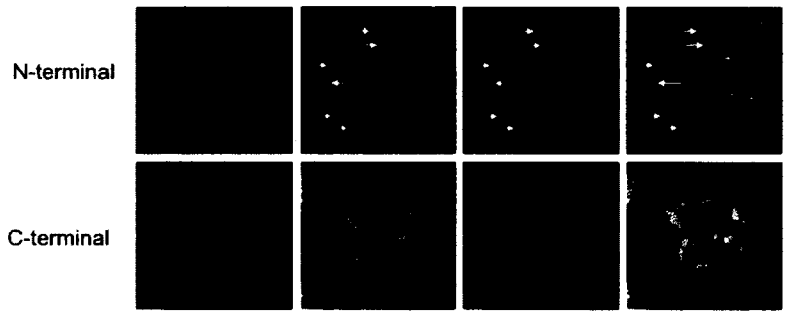
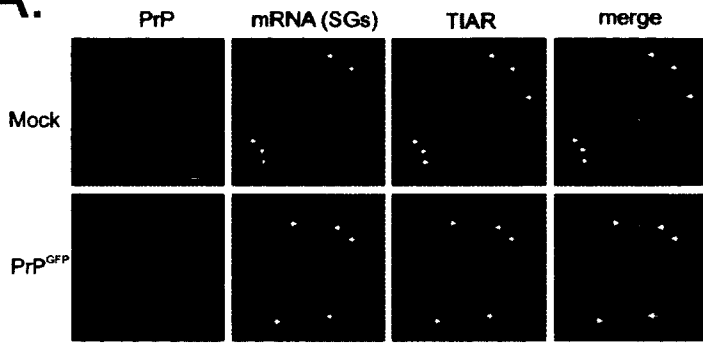
# Figure suppl 1



# Figure suppl 2



A.



## FIGURE LEGENDS :

**Figure 1** **Familial PrP<sup>C</sup> mutants induce the cellular stress response eiF2 $\alpha$  dependent by the activation of PACT/PKR pathway in N2a cells.** (A) Western blot analysis of phosphorylated eiF2 $\alpha$  (Ser51) and PKR (Thr446) reveal their activation by familial PrP<sup>C</sup> mutants expression. P-eiF2 $\alpha$  and P-PKR bands are normalized to total eiF2 $\alpha$  and total PKR, respectively. Western blot of transfected PrP<sup>C</sup> are also shown. (B) Induction of eiF2 $\alpha$  phosphorylation expressed as units relative to PrP<sup>C</sup>. (C) Activation of PKR expressed as units relative to PrP<sup>C</sup>. (D) Induction of PACT expression is related to PrP<sup>C</sup>. (E) Confocal microscopy of phosphorylated eiF2 $\alpha$  (white channel) in N2a cells transfected with PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel). Scale bars: 10  $\mu$ m.

**Figure 2:** **Familial PrP<sup>C</sup> mutants inhibit SGs formation under cellular stress conditions independently of eiF2 $\alpha$  phosphorylation.** (A) SGs formation following heat stress is visualized by confocal microscopy of N2a transfected with PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel) treated for FISH with an oligo(dT) probe that detects poly (A) mRNA (red channel). Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) SGs inhibition is expressed as the relative proportion of positive SGs cells in 100 transfected over 100 untransfected cells from the same slide. (C) Normal induction of eiF2 $\alpha$  in N2a under heat stress is shown by western blot analysis of phosphorylated eiF2 $\alpha$  (Ser51). (D) N2a transfected cells survival following thermal stress is evaluated by an XTT assay and normalized to cells transfected with the PrP<sup>C</sup>.

**Figure 3: Familial PrP mutants interfere with P-bodies formation.** (A) P-bodies formation is monitored in N2a cells by confocal microscopy of the P-bodies marker DDX6 (white channel) and transfected PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel). Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) P-bodies inhibition is expressed as the relative proportion of cells positive for P-bodies in 100 cells from the same slide. (C) Western blot analyses of DDX6, DCP1a,  $\beta$ -actin and transfected PrP<sup>C</sup> confirm overall equal amounts of the two P-bodies markers.

**Figure 4: Familial PrP mutants inhibit siRNA activity** (D) Diagram of Firefly luciferase (FLuc) and Renilla luciferase (RLuc) activity reporters. FLuc activity is normalized to RLuc activity. The siRNA activity is determined by the ratio of normalized FLuc activity from cells transfected with the FLuc siRNA to the normalized FLuc activity from cells transfected with the negative control siRNA. (E) Diagram of the experimental design. (F) The siRNA activity (siRNA RLuc / ctrl siRNA luciferase ratio) was determined in HEK293 cells transfected with the empty vector or PrP constructs. The siRNA activity in PrP<sup>C</sup> or familial mutants transfected cells is expressed relative to empty vector transfection. Error bars indicate s.d. (n=5, T test \*P<0,001, \*\*P = 0,02 and One Way Analysis of Variance Holm-Sidak method P<0,001).

**Figure 5: P-bodies interaction with PrP<sup>C</sup> and Ago2 depends on PrP<sup>C</sup> OR.** (A) Colocalization of PrP<sup>C</sup> (green channel) and P-bodies marker dcp1a (red channel) is revealed by confocal microscopy. Right panels represent the overlapping green and red

signals. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** The interaction of PrP<sup>C</sup> with P-bodies is confirmed by western blot analysis of endogenous PrP<sup>C</sup> and dcp1a in dcp1a immunoprecipitates (IP) from N2a cells. **(C)** The importance of PrP OR in the association between PrP<sup>C</sup> with P-bodies is determined by western blot analysis of Ago2, dcp1a and PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> after immunoprecipitation of GFP from N2a cells expressing PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup>. **(D)** Implication of PrP<sup>C</sup> OR in the association of Ago2 with P-bodies is confirmed by western blot analysis of Ago2, dcp1a and PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup> in Ago2 immunoprecipitate of cells expressing PrP<sup>GFP</sup> or PrP $\Delta$ OR<sup>GFP</sup>.

**Figure 6: PrP<sup>Sc</sup> inhibit SGs and P-bodies formation as familial PrP mutants.** **(A)** Western blot analysis of PrP PK resistance to show that MOV5 cells are infected or not. **(B)** SGs formation following cellular stress (thermal) is visualized by confocal microscopy of TIA-1 (green channel) and TIAR (red channel). **(C)** SGs formation is expressed as the proportion of positive SGs cells in 50 MOV or 50 Sc MOV cells. **(D)** P-bodies formation is monitored by confocal microscopy of DDX6 (green channel) and dcp1a (red channel). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **(D)** P-bodies formation expressed as the proportion of cells containing P-bodies in 50 MOV or 50 Sc MOV cells.

**Figure 7: CyPrP sequesters proteins normally localized in SGs and P-bodies.** Confocal microscopy of hnRNPA1 **(A)** and PABP1 **(B)** (white channel) after a thermal stress, two proteins normally localized to SGs under this condition, in N2a cells expressing CyPrP<sup>GFPC1</sup> (green channel) or mock-transfected cells expressing endogenous

PrP. Confocal microscopy of P-bodies markers dcpl1a (C) and GW182 (D) (white channel) in N2a cells expressing CyPrP<sup>GFPC1</sup> (green channel) or mock-transfected. Scale bars: 10  $\mu$ m.

**Suppl. Figure 1: Familial PrP<sup>C</sup> mutants induce the cellular stress response eiF2 $\alpha$  dependent by the activation of PKR pathway in HEK293 cells. (A) Graphic represent the induction of eiF2 $\alpha$  phosphorylation which is expressed as units relative to PrP<sup>C</sup>. (B) Graphic represent the activation of PKR which is expressed as units relative to PrP<sup>C</sup>.**

**Suppl. Figure 2: C-terminal domain of CyPrP inhibit SGs formation under cellular stress conditions. (A) SGs formation following heat stress is visualized by confocal microscopy of N2a cells transfected with PrP<sup>C</sup> or familial mutants (green channel) treated for FISH with an oligo(dT) probe that detects poly (A) mRNA (red channel). Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) SGs formation is expressed as the relative proportion of positive SGs cells in 100 cells from the same slide.**