

Université de Montréal

Caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2

par

Marjolaine Maher Laporte

Département de biochimie de l'Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
(Ph.D.) en Biochimie

Novembre 2010

© Marjolaine Maher Laporte, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2

présentée par :

Marjolaine Maher Laporte

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, président-rapporteur
Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Pascal Chartrand, membre du jury
François Dragon, examinateur externe
Jannic Boehm, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Dans la cellule, chaque ARNm se doit d'être régulé finement au niveau transcriptionnel, bien entendu, mais également au niveau de sa traduction, de sa dégradation ainsi que de sa localisation intracellulaire, et ce, afin de permettre l'expression de chaque produit protéique au moment et à l'endroit précis où son action est requise.

Lorsqu'un mécanisme physiologique est mis de l'avant dans la cellule, il arrive souvent que plusieurs ARNm se doivent d'être régulés simultanément. L'un des moyens permettant d'orchestrer un tel processus est de réguler l'action d'une protéine commune associée à chacun de ces ARNm, via un mécanisme post-traductionnel par exemple. Ainsi l'expression d'un groupe précis d'ARNm peut être régulée finement dans le temps et dans l'espace selon les facteurs protéiques auxquels il est associé.

Dans l'optique d'étudier certains de ces complexes ribonucléoprotéiques (mRNP), nous nous sommes intéressés aux isoformes et paralogues de Staufén, une protéine à domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD) impliquée dans de nombreux aspects de la régulation post-transcriptionnelle, tels la dégradation, la traduction ou encore la localisation d'ARNm. Chez la drosophile, un seul gène Staufén est exprimé alors que chez les mammifères, il existe deux paralogues de la protéine, soit Stau1 et Stau2, tous deux possédant divers isoformes produits suite à l'épissage alternatif de leur gène.

Stau1 et Stau2 sont identiques à 50%. Les deux isoformes de Stau2, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² ne diffèrent qu'en leur extrémité N-terminale. En effet, alors que Stau2⁵⁹ arbore un dsRBD1 tronqué, celui de Stau2⁶² est complet. Ces observations introduisent une problématique très intéressante à laquelle nous nous sommes attaqué : ces différentes protéines, quoique très semblables, font-elles partie de complexes ribonucléoprotéiques distincts ayant des fonctions propres à chacun ou, au contraire, vu cette similarité de séquence, travaillent-elles de concert au sein des mêmes complexes ribonucléoprotéiques?

Afin d'adresser cette question, nous avons entrepris d'isoler, à partir de cellules HEK293T, les différents complexes de Stau1 et Stau2 par la technique d'immunoprécipitation. Nous avons isolé les ARNm associés à chaque protéine, les avons identifiés grâce aux micropuces d'ADN et avons confirmé nos résultats par RT-PCR. Malgré la présence d'une population commune d'ARNm associée à Stau1 et Stau2, la majorité des transcrits identifiés furent spécifiques à chaque orthologue. Cependant, nous avons remarqué que les diverses populations d'ARNm participaient aux mêmes mécanismes de régulation, ce qui suggère que ces deux protéines possèdent des rôles complémentaires dans la mise en œuvre de divers phénomènes cellulaires. Au contraire, les transcrits associés à Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² sont davantage similaires, indiquant que celles-ci auraient des fonctions plutôt semblables. Ces résultats sont très intéressants, car pour la première fois, nous avons identifié des populations d'ARNm associées aux isoformes Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶². De plus, nous les avons analysées en parallèle afin d'en faire ressortir les populations spécifiques à chacune de ces protéines.

Ensuite, connaissant l'importance de Stau2 dans le transport dendritique d'ARNm, nous avons cherché à caractériser les complexes ribonucléoprotéiques neuronaux associés à celle-ci. Dans un premier temps et à l'aide de la technique d'immunoprécipitation, nous avons identifié une population d'ARNm neuronaux associés à Stau2. Plus de 1700 ARNm montraient une présence d'au moins huit fois supérieure dans le précipité obtenu avec l'anticorps anti-Stau2 par rapport à celui obtenu avec le sérum pré-immun. Ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans des processus de modifications post-traductionnelles, de traduction, de transport intracellulaire et de métabolisme de l'ARN. De façon intéressante, cette population d'ARNm isolée du cerveau de rat est relativement différente de celle caractérisée des cellules humaines HEK293T. Ceci suggère que la spécificité d'association Stau2-ARNm peut différer d'un tissu à un autre.

Dans un deuxième temps, nous avons isolé les protéines présentes dans les complexes ribonucléoprotéiques obtenus de cerveaux de rat et les avons identifiées par

analyse en spectrométrie de masse. De cette façon, nous avons identifié au sein des particules de Stau2 des protéines liant l'ARN (PABPC1, hnRNPH1, YB1, hsc70), des protéines du cytosquelette (α - et β -tubuline), de même que la protéine peu caractérisée RUFY3. En poussant davantage la caractérisation, nous avons établi que YB1 et PABPC1 étaient associées à Stau2 grâce à la présence de l'ARN, alors que la protéine hsc70, au contraire, interagissait directement avec celle-ci. Enfin, cette dernière association semble être modulable par l'action de l'ATP. Ce résultat offre de nombreuses possibilités quant à la régulation de la fonction de Stau2 et/ou de son mRNP. Entre autres, cette étude suggère un mécanisme de régulation de la traduction au sein de ces particules.

Pour faire suite à la caractérisation des mRNP de Stau, nous avons voulu déterminer au niveau neurophysiologique l'importance de ceux-ci. Comme l'étude de Stau2 avait déjà été entreprise préalablement par un autre laboratoire, nous avons décidé de concentrer notre étude sur le rôle de Stau1. Ainsi, nous avons démontré que celle-ci était nécessaire à la mise en place d'une forme de plasticité synaptique à long terme, la forme tardive de potentialisation à long terme ou L-LTP, dépendante de la transcription et de l'activité des récepteurs NMDA.

La transmission de base, de même que la faculté de ces épines à faire de la E-LTP, la forme précoce de potentialisation à long terme, et la dépression à long terme ou LTD sont conservées. Ceci indique que les épines conservent la capacité d'être modulées. Ainsi, l'inhibition de la L-LTP, suite à la sous-expression de Stau1, n'est pas simplement due à la perte d'éléments fonctionnels, mais réside plutôt dans l'incapacité de ceux-ci à induire les changements synaptiques spécifiquement nécessaires à la mise en place de la L-LTP. De plus, au niveau synaptique, la sous-expression de Stau1 réduit à la fois l'amplitude et la fréquence des mEPSC. Ces résultats concordent avec l'observation que la sous-expression de Stau1 augmente significativement la proportion d'épines allongées et filopodales, des épines formant des synapses dites silencieuses. Par le fait même, elle diminue le nombre d'épines fonctionnelles, de forme dite normale.

Ainsi, nous avons été en mesure de démontrer que l'absence, au niveau neuronal, de la protéine Stau1 induisait un déficit probable dans la localisation et/ou la traduction d'ARNm responsable de la restructuration de l'épine et de facteurs nécessaires à la mise en place de la L-LTP.

En conclusion, nous avons participé à lever le voile sur la composition et l'importance des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1 et Stau2. Nous avons identifié des populations distinctes et communes d'ARNm associées aux différents isoformes de Stau, à partir des mRNP présents au sein des cellules HEK293. De plus, nous avons réussi à mettre à l'avant plan certaines composantes des mRNP neuronaux de Stau2, dont un partenaire protéique direct, hsc70, partenaire dont l'association est modulable par l'action de l'ATP, ainsi qu'une population neuronale de transcrits d'ARNm. Enfin, nous avons mis en lumière l'importance de Stau1 dans la morphologie des épines dendritiques ainsi que dans le phénomène de la plasticité synaptique.

Mots-clés : mRNP, Stau1, Stau2, transport, ARNm épines dendritiques, plasticité synaptique

ABSTRACT

In the cell, the expression of each mRNA is finely tuned transcriptionally, but also, at the level of translation, degradation and intracellular localisation. These mechanisms of regulation are important in order to control the expression of each translational product at the right time and place. When a physiological phenomenon is activated, the expression of multiple functionally-related mRNAs must be simultaneously regulated. To orchestrate the coordinated expression of all the transcripts that respond to specific cell needs, it is advantageous to regulate the function of a common trans-acting factor that associates with them. Such a mechanism permits to control the fate of a sub-population of mRNAs according to the factors to which they are bound.

As a means to learn more about the regulation of mRNAs in ribonucleoprotein complexes (mRNP), we decided to focus our study on the characterisation of Staufens-associated mRNPs. In mammalian cells, two Staufens paralogs, Stau1 and Stau2, are expressed and each gene generates different isoforms through differential splicing. Staufens proteins are double-stranded RNA binding proteins implicated in numerous aspects of the post-transcriptional regulation of mRNAs such as degradation, translation and localisation.

Stau1 and Stau2 are similar proteins with an overall percentage identity of around 50%. This percentage increases to near 75% when only the functional double-stranded RNA-binding domains (dsRBD3) are compared. Similarly, Stau2 isoforms, Stau2⁵⁹ and Stau2⁶², are perfectly identical except at the N-terminal extremity where the sequence of Stau2⁶² is extended as compared to that of Stau2⁵⁹. Therefore, their RNA-binding domain 3 are perfectly identical. These observations bring in an interesting problematic. Are those almost identical proteins part of the same mRNP, acting in conjunction or, despite their high similarities, are they part of distinct mRNP participating in specific function?

In order to address this question, we decided to immunoprecipitate from HEK293 cells, Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ and Stau2⁶²-associated mRNPs and identify bound mRNAs. Resulting mRNAs isolated from each complex were identified by microarray analysis. There is a predominance of mRNAs involved in cell metabolism, transport, transcription and regulation of cell processes. The presence of at least some of these transcripts in specific mRNP was confirmed by RT-PCR. Despite the presence of a common population of mRNA associated with both Stau1 and Stau2, the majority of the transcripts were specific to each paralog. Interestingly, we observed that transcripts associated with either Stau1 or Stau2 were nevertheless involved in the same pathways of cell regulation, suggesting that both proteins have complementary roles in the same cellular processes. On the other hand, mRNAs associated with Stau2⁵⁹ and Stau2⁶² were more similar. This suggests that these two isoforms might have more overlapping functions.

Consistent with a model of post-transcriptional gene regulation, our results show that Stau1- and Stau2-mRNPs associate with distinct but overlapping sets of cellular mRNAs and that these mRNAs are nevertheless involved in common pathways. It is consistent with the high degree of sequence similarity between Stau1 and Stau2 that predicts that they may have conserved convergent functions and with the observation that they are distributed in distinct mRNP complexes in neurites.

Knowing the importance of Stau2 in the transport of dendritic mRNA and to further understand the molecular mechanisms by which it modulates synaptic function, we decided to characterise Stau2-containing mRNPs in neurons. Using anti-Stau2 antibody to immunoprecipitate the mRNPs, we have identified a population of more than 1700 transcripts associated with Stau2 in embryonic rat brain. These mRNAs code for proteins involved in cellular processes such as post-translational modification, translation, intracellular transport and RNA metabolism. Interestingly, Stau2-associated mRNAs isolated from rat brains are relatively different from those isolated from HEK293 cells. This

result suggests that the specificity of Stau2-mRNA association can differ from one tissue to the other.

Similarly, we have identified the proteins presents in Stau2-containing complexes isolated from embryonic rat brains by a proteomic approach. We were able to determine the presence of mRNA-binding proteins (PABPC1, hnRNP H1, YB1 and hsc70), proteins of the cytoskeleton (α - and β -tubulin) and RUFY3 a poorly characterized protein. While PABPC1 and YB1 associate with Stau2-containing mRNPs through RNAs, hsc70 is directly bound to Stau2 and this interaction is regulated by ATP. The presence of the RNA-binding proteins YB1 and PABPC1, both involved in translation regulation, suggests that the expression of Stau2-bound mRNAs may be regulated at the level of translation initiation.

Finally, it is well known that synaptic plasticity requires mRNA transport in dendrites and their local translation. Since the study of the neurophysiological role of Stau2 was already in progress we decided to concentrate our energy on the function of Stau1. Therefore, we studied the importance of Stau1 protein at the neurophysiological level, especially looking for a role in synaptic plasticity. We were able to demonstrate that Stau1 is required for the late form of long term synaptic potentiation, L-LTP, a plasticity dependent not only on local translation of mRNAs, but also on newly transcribed and transported mRNAs. Using hippocampal slices, we showed that Stau1 down-regulation by RNA interference prevents the development and/or maintenance of L-LTP. However, neurons displayed normal early-LTP, mGluR1/5-mediated long-term depression, or basal evoked synaptic transmission. In addition, at the cellular level, Stau1 down-regulation shifted spine shape from regular to elongated spines, without changes in spine density. The change in spine shape could be rescued by an RNA interference-resistant Stau1 isoform. Therefore, Stau1 is important for processing and/or transporting in dendrites mRNAs that are critical in regulation of synaptic strength and maintenance of functional connectivity changes underlying hippocampus dependent learning and memory.

In conclusion we were able to further reveal the composition and the importance of the Stau1 and Stau2 mRNP. First, we have identified distinct and overlapping population of mRNAs associated to the diverse isoform of Stau, from HEK293 cells. Second, we were able to identify a population of neuronal transcript as well as some proteins factors present in the Stau2 particles. One of which, hsc70, is directly bound to Stau2 and its interaction is regulated by the presence of ATP. Finally, we have demonstrated the importance of Stau1 in the morphology of the dendritic spine as well as its fundamental implication in synaptic plasticity.

Keywords : mRNP, Stau1, Stau2, transport, mRNA, dendritic spines, synaptic plasticity

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xx
LISTE DES FIGURES.....	xxi
REMERCIEMENTS.....	xxviii
INTRODUCTION	1
1. Complexes ribonucléoprotéiques (mRNP)	1
1.1. La théorie des régulateurs d'ARNm	1
1.2. Introduction aux divers complexes ribonucléoprotéiques responsables de la régulation traductionnelle	6
1.2.1. Les miRNA et le complexe RISC	6
1.2.2. Les P-bodies	8
1.2.3. Les granules de stress.....	9
1.2.4. Les particules et granules de transport.....	11
1.3. Caractérisation de complexes ribonucléoprotéiques.....	13
1.3.1. Analyses protéomiques de complexes ribonucléoprotéiques.....	13
1.3.2. Études par Micro Puce d'ADN des ARNm présents dans certains mRNP..	19
2. Transport et traduction d'ARNm neuronaux	31
2.1. Les nombreuses implications de la traduction locale d'ARNm.....	31
2.2. Fonction de la traduction localisée sur la modulation synaptique : LTP et LTD	35
2.2.1. Mise en place de la LTP.....	39
2.2.2. Mise en place de la LTD	40
2.3. Principales étapes de la localisation dendritique d'ARNm.....	42
2.3.1. Initiation nucléaire du transport d'ARNm	42
2.3.2. L'export nucléaire	42

2.3.3.	Les diverses voies de transport empruntées	44
2.3.4.	Les types de mouvements observés	46
2.3.5.	Les moteurs moléculaires.....	46
2.3.6.	Les signaux qui induisent la localisation	47
2.3.7.	La répression traductionnelle lors du transport de l'ARNm	50
2.3.8.	Qu'arrive-t-il à l'ARNm une fois arrivé à sa destination?	54
2.4.	Protéines impliquées dans le transport dendritique d'ARNm.....	60
2.4.1.	CPEB.....	60
2.4.2.	ELAV (HuB/HuC/HuD)	60
2.4.3.	RNG-105/Caprin-1/RACK	61
2.4.4.	ZBP1	62
2.4.5.	hnRNPA2	64
2.4.6.	FMRP	65
2.4.7.	Staufen	66
2.5.	Morphologie des épines synaptiques	67
2.6.	Séquence de localisation dendritique	69
3.	Staufen	70
3.1.	Staufen est une protéine à dsRBD exprimée chez de nombreuses espèces	70
3.1.1.	Les divers isoformes de la protéine Staufen	71
3.1.2.	hStau1	71
3.1.3.	mStau1 et mStau ⁱ	74
3.1.4.	Isoforme spécifique à l'oligodendrocyte.....	74
3.1.5.	rStau1 et rStau ⁱ	74
3.1.6.	rStau2 et mStau2	75
3.1.7.	xStau1 et xStau2.....	76
3.1.8.	zStau1 et zStau2	77
3.2.	Staufen est une protéine possédant plusieurs domaines dsRBD.....	77
3.2.1.	Le dsRBD (domaine de liaison à l'ARN double-brin)	77

3.2.2.	Spécificité de liaison des protéines à dsRBD.....	78
3.3.	La localisation intracellulaire de mStaufen et son association aux divers organites	
	81	
3.3.1.	Réticulum endoplasmique rugueux.....	81
3.3.2.	Ribosome	82
3.3.3.	Golgi et voie de l'endocytose.....	83
3.3.4.	Microtubules	84
3.3.5.	Localisation neuronale	85
3.3.6.	Transit nucléaire.....	85
3.4.	Structures d'ARNm liées par Staufen.....	89
3.4.1.	Liaison de dStau à l'ARNm de bicoid	89
3.4.2.	L'ARNm de Arf1 contient un élément de liaison à mStau1 appelé SBS (staufen binding site).....	90
3.5.	Divers rôles et fonctions de Staufen au niveau de la traduction	90
3.5.1.	Rôle chez la drosophile.....	92
3.5.2.	Rôle dans les cellules de mammifère.....	92
3.6.	Rôle de Staufen dans la dégradation d'ARNm	93
3.6.1.	Un survol du NMD	93
3.6.2.	Le mécanisme du SMD.....	94
3.6.3.	La relation entre le NMD et le SMD en est une de compétition.....	95
3.7.	Rôle de Staufen dans le transport et la régulation de divers ARNm non-neuronaux	
	96	
3.7.1.	dStau et le transport des ARNm bicoid et oskar, respectivement au pôle antérieur et postérieur de l'ovocyte de la drosophile	96
3.7.2.	xStau est responsable du transport tardif des transcrits Vg1 et VgT au pôle végétal de l'ovocyte du Xenope.....	96
3.7.3.	Identification d'ARNm liés par hStau1 et importance de hStau1 dans la stabilité de ceux-ci	97

4.	Les complexes ribonucléoprotéiques de Staufen	99
4.1.	Importance des partenaires protéiques dans la fonction de dStau.....	99
4.1.1.	Hrp48	99
4.1.2.	Y14.....	99
4.1.3.	Barentsz.....	100
4.1.4.	Importance selon le stade de développement cellulaire.....	100
4.2.	mRNP mStau1 : colocalisation avec divers partenaires protéiques	101
4.2.1.	Pur- α	101
4.2.2.	FMRP	101
4.2.3.	Barentsz.....	102
4.2.4.	Phosphatase-1.....	102
4.2.5.	Études par protéomiques des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1 ..	103
4.3.	mRNP de Stau2: colocalisation avec divers partenaires protéiques	106
4.3.1.	ZFR	106
4.3.2.	Y14/Mago/p62/Tap.....	107
5.	Rôle de Staufen dans la localisation dendritique d'ARNm	109
5.1.	Stau1 et Stau2 font partie des granules et des particules de transport d'ARNm	109
5.2.	Staufen se déplace le long des dendrites sur le réseau de microtubules et est responsable de la localisation d'ARNm.....	111
5.2.1.	Rôle de Stau1 dans le transport général de l'ARNm	112
5.2.2.	Rôle de Stau2 dans le transport général de l'ARNm	113
5.3.	Rôle de Stau dans la localisation d'ARNm neuronaux chez divers organismes	114
5.3.1.	Transport de l'ARNm prospero dans le neuroblaste.....	114
5.3.2.	Transport d'ARNm nécessaire à la LTM chez la drosophile.....	114
5.3.3.	Transport de l'ARNm Syntaxine chez l'Aplysie	115
5.4.	Rôle de Stau dans le transport dendritique d'ARNm chez les mammifères	116
5.4.1.	Stau1 et le transport dendritique d'ARNm.....	116
5.4.2.	Stau2 et le transport dendritique d'ARNm.....	118

5.5. Rôle physiologique de Stau dans les neurones de l'hippocampe.....	119
5.5.1. Importance neurophysiologique de Stau1	119
5.5.2. Importance neurophysiologique de Stau2.....	120
Problématiques.....	122
Hypothèse de recherches.....	124
Objectif de recherche	125
Approche expérimentale	126
RÉSULTATS	127
ARTICLE 1: A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes.....	127
MISE EN CONTEXTE.....	127
ABSTRACT	129
INTRODUCTION	130
RESULTS	133
Stau1- and Stau2-containing RNP complexes co-purify with RNA.....	133
Microarray analysis of Staufen associated mRNAs.....	134
A large percentage of mRNA is specific for either Stau1 ⁵⁵ - and Stau2-associated mRNPs	135
Stau2 ⁶² - and Stau2 ⁵⁹ -associated mRNPs share common mRNAs	135
RT-PCR validation of enriched mRNAs.....	136
Enriched mRNAs are involved in diverse cellular functions.....	137
DISCUSSION	139
Staufen-bound mRNAs	139
GO distribution	140
Comparison to other RNPs	142
Staufen-binding site	143
MATERIALS AND METHODS.....	146

Immunopurifications.....	146
Microarray analysis.....	146
RT-PCR amplification	147
<i>ACKNOWLEDGMENTS</i>	148
REFERENCES.....	149
FIGURES AND LEGENDS	154
ARTICLE 2: Stau1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells.....	170
MISE EN CONTEXTE.....	170
ABSTRACT	172
INTRODUCTION	173
RESULTS	175
Down-regulation of Stau1 by siRNA transfection.....	175
Stau1 down-regulation impairs specifically late LTP.....	177
Stau1 down-regulation reduces miniature synaptic activity	179
Stau1 down-regulation induces dendritic spine morphology changes.....	181
DISCUSSION	184
Role of Stau1 in long-term synaptic plasticity.....	185
Role of Stau1 in spine morphogenesis and spontaneous miniature synaptic activity	186
Staufen isoforms and functional implications.....	187
MATERIALS AND METHODS.....	189
Organotypic hippocampal slice cultures.....	189
HEK293 cells	189
siRNAs and transfections.....	190
Electrophysiology	190
Immunocytochemistry	192
Western Blotting	193
Imaging and morphological analysis	193

Statistical analysis	194
<i>ACKNOWLEDGEMENTS</i>	195
REFERENCES.....	196
FIGURES AND LEGENDS	203
ARTICLE 3: Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains.....	219
MISE EN CONTEXTE.....	219
ABSTRACT	221
INTRODUCTION	222
RESULTS	224
Identification of mRNAs in Stau2-containing mRNPs in embryonic brains.....	224
RT-PCR validation of identified mRNAs.....	225
Gene ontology (GO).....	225
DISCUSSION	226
MATERIALS AND METHODS.....	229
Immunoprecipitation.....	229
Microarray hybridization and RT-PCR validation.....	229
<i>ACKNOWLEDGMENTS</i>	231
REREFENCES.....	232
FIGURES AND LEGENDS	236
ARTICLE 4: Molecular composition of Staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain	240
MISE EN CONTEXTE.....	240
ABSTRACT	242
INTRODUCTION	243
RESULTS	245
Isolation and characterization of Stau2-containing mRNPs	245
PABPC1, YB1, and hsc70 co-immunoprecipitate with Stau2 ⁶² and Stau2 ⁵⁹	245

Direct interaction between hsc70 and Stau2 ⁶²	246
ATP modulates the interaction between hsc70 and Stau2 ⁶²	247
Co-localisation of Stau2 isoforms with YB1 and PABPC1 in dendrites of hippocampal neurons	247
DISCUSSION	249
MATERIALS AND METHODS	254
Ethics statement	254
Immunoprecipitation and immunoblotting	254
Proteomic techniques	255
Protein co-localisation in hippocampal neurons	256
Protein expression and purification	256
GST-pull down assay	257
Surface plasmon resonance (SPR) binding assay	257
ACKNOWLEDGMENTS	259
REREFENCES	260
FIGURES AND LEGENDS	266
DISCUSSION	279
<i>Approche utilisée dans l'identification des populations d'ARNm associées à Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²</i>	279
<i>Identification des populations communes et distinctes d'ARNm au sein des mRNP de Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²</i>	281
<i>Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² ont des rôles à la fois complémentaires et redondants et sont associées à des transcrits participants à de nombreuses fonctions cellulaires</i>	283
<i>Les populations d'ARNm liées par les différents isoformes de Staufen sont distinctes de celles présentes dans d'autres complexes de transport</i>	285
<i>Étude comparative des populations d'ARNm associées à Stau1</i>	286
Caractérisation des mRNP neuronaux de Staufen2	287
<i>Identification des ARNm associés aux complexes neuronaux de Stau2</i>	287

<i>Identification de facteurs protéiques associés aux complexes neuronaux de Stau2</i>	290
<i>Présence de PABPC1, YB1, et hsc70 dans les mRNP de Stau2⁶² et Stau2⁵⁹</i>	292
<i>Intéraction protéine-protéine directe entre Stau2 et hsc70</i>	293
<i>Faible colocalisation dendritique entre Stau2 et PABPC1, YB1, hsc70 et hnRNPH1</i> ..	295
Importance de Stau1 et Stau2 au niveau de la physiologie neuronale	296
<i>Rôle de Stau1 au niveau de la potentialisation à long terme, la L-LTP</i>	296
<i>Rôle de Stau1 au niveau de la morphologie des épines</i>	299
<i>Stau1 est nécessaire à la L-LTP alors que Stau2 est responsable de la LTD</i>	301
PERSPECTIVE.....	303
CONCLUSION.....	305
BIBLIOGRAPHIE	I
ANNEXE I : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article1).....	XXIV
ANNEXE II : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article2)	XXVII
ANNEXE III : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article3).....	XXXII
ANNEXE IV : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article4).....	XXXIV

LISTE DES TABLEAUX

RÉSULTATS

ARTICLE 1: A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes

TABLE 1: List of genes differentially found in Stau1 or Stau2 mRNPs and used for RT-PCR amplification.....	156
TABLE 2: Summary of DAVID GO classification of target mRNA population.....	157
TABLE 3: mRNAs associated with both Stau1 ⁵⁵ -HA (this study) and FMRP	158

ARTICLE 4 : Molecular composition of Staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain

TABLE 1 : Proteomically identified proteins in Stau2-containing mRNPs.	278
---	-----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

FIGURE 1 : Interrelation entre les différentes voies de régulation post-transcriptionnelle ..	3
FIGURE 2 : Régulation post-transcriptionnelle coordonnée de différentes sous-populations d'ARNm, selon les facteurs auxquels elles sont associées	4
FIGURE 3 : Modèle conceptuel d'une cellule de mammifère démontrant l'interrelation entre les P-bodies, les granules de stress et les mRNP de transport	12
FIGURE 4 : Coimmunoprécipitation et identification des diverses composantes d'un mRNP	14
FIGURE 5 : Exemple classique d'ARNm localisés.....	32
FIGURE 6 : Survol des différents mécanismes de localisation d'ARN	33
FIGURE 7 : Exemples de modèles synaptiques de LTP et de LTD	37
FIGURE 8 : Modèle de localisation d'ARNm dans un neurone de mammifère	41
FIGURE 9 : Tranche d'hippocampe en culture	49
FIGURE 10 : Exemples de mécanismes de répression traductionnelle.....	51
FIGURE 11 : Contrôle de la traduction au niveau de l'épine synaptique.....	56
FIGURE 12 : Différentes morphologies adoptées par les épines synaptiques.....	68
FIGURE 13 : Paralogues et isoformes de Staufen	72
FIGURE 14 : Domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD)	79
FIGURE 15 : Structures d'ARN liées par Stau.....	91

RÉSULTATS

ARTICLE 1: A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes

FIGURE 1: Comparison of the Staufen paralogues.....	154
FIGURE 2: Stau1 and Stau2 co-purify with RNA.....	156
FIGURE 3: Venn diagrams summarizing microarray analysis results.	158
FIGURE 4: Expression of Staufen-tagged proteins.....	160
FIGURE 5: RT-PCR amplification of selected mRNA following mRNPs immunoprecipitation.	162
FIGURE 6 : RT-PCR amplification of selected endogenous mRNA following Stau1 or Stau2 immunoprecipitation.	164

ARTICLE 2: Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

FIGURE 1: Down-regulation of Stau1 by siRNA in HEK293 cells and in cultured hippocampal neurons.	203
FIGURE 2: Down-regulation of Stau1 by siRNA in organotypic hippocampal slice cultures.....	205
FIGURE 3: Stau1 siRNA transfection impairs chemically induced late-LTP in hippocampal slice cultures.....	207
FIGURE 4: Stau1 siRNA transfection does not impair early-LTP in hippocampal slice cultures.....	209

FIGURE 5: Stau1 siRNA transfection does not affect mGluR-dependent LTD in hippocampal slice cultures.	211
FIGURE 6: Stau1 siRNA transfection reduces frequency and amplitude of mEPSCs.....	213
FIGURE 7: Stau1 siRNA transfection affects dendritic spine morphology.	215
FIGURE 8: Dendritic spine morphology changes induced by Stau1 down-regulation using Stau1 shRNA and rescue by co-expression of Stau1 ⁵⁵ Δsh1.	217

ARTICLE 3: Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains

FIGURE 1 :Immunoprecipitation of Stau2 isoforms.	236
FIGURE 2: RT-PCR amplification of selected mRNAs following mRNPs immunoprecipitation.	238

ARTICLE 4 : Molecular composition of Staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain

FIGURE 1: Immunoprecipitation of Stau2 isoforms.	266
FIGURE 2: RNA-binding proteins are associated with Stau2 isoforms in mRNPs.	268
FIGURE 3: MBP-Stau2 ⁶² binds GST-hsc70 through protein-protein interaction.	270
FIGURE 4: The interaction between Stau2 ⁶² and hsc70 is abolished in the presence of ATP.	272
FIGURE 5: Co-localization of endogenous Stau2 with PABPC1-myc, YB1-CFP, hsc70-CFP and hnRNP H1-myc in hippocampal neurons.	274
FIGURE 6 : Co-localization of Stau2 ⁶² -HA ₃ with endogenous PABPC1 and YB1 in hippocampal neurons.	276

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARE : « AU-rich element »

APRA : amplification d'ARN par positionnement d'anticorps

ARN : acide ribonucléoprotéique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine tri phosphate

CPE : « cytoplasmic polyadenylation element »

CPEB : « cytoplasmic polyadenylation element binding protein »

DCP bodies : « decapping protein containing bodies »

dsRBD : « double stranded RNA binding domain »

DTE : « dendritic targeting element »

ECS : électroconvulsion

E-LTP : « early long term potentiation »

EPSP : « excitatory post-synaptic potential »

FMRP : « Fragile X mental retardation protein »

GW : « glycine- et tryptophan- rich cytoplasmic processing bodies »

HFS : « high-frequency stimulation »

hnRNPH1 : « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 »

hsc70 : « heat-shock cognate 70 »

IMP : « insulin growth factor II mRNA-binding protein »

IP : immunoprécipitation

IRES : « internal ribosome entry site »

KH : domaines d'homologie à la ribonucléoprotéine K

KHC : « kinesin heavy chain »

KLC : « kinesin light chain »

KO : « knockout »

L-LTP : « late long term potentiation »

LTD : « long term depression »
LTM : « long term memory »
mEPSC : « spontaneous *miniature* excitatory post-synaptic current »
mGluR : « metabotropic glutamate receptor »
miRNA : micro ARN
mRNP : complexe ribonucléoprotéique
NES : « nuclear export signal »
NLS : « nuclear localization signal »
NMD : « Nonsense-mediated decay »
NMDA : récepteur *N-Methyl-D-aspartate*
PABP : « poly-A binding protein »
PB : « processing bodie »
PKC: protéine kinase C
PSD : « postsynaptic density »
RGG : domaine riche en acide aminé arginine et glycine
RIP-CHIP : « RNA immunoprecipitation and microarray analysis »
RISC : « RNA-Induced Silencing Complex »
RNA : « Ribonucleic acid »
RNP : « RNA binding protein »
RRM : « RNA recognition motif »
RT-PCR : « Reverse transcription polymerase chain reaction »
SBS : « Staufen binding site »
SELEX : « Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment »
SG : « Stress granule »
siRNA : « small interfering RNA »
SMD : « Staufen mediated decay »
TBD : « tubulin binding domain »
TBS : « theta burst stimulation »

UTR : « untranslated region »

WT : « wild type »

YB : « Y-box binding protein »

YFP : « Yellow fluorescent protein »

*À Papa, Maman et Nini...
pour leurs précieux encouragements
et la place qu'ils occupent dans mon cœur*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Luc, mon directeur de thèse, qui m'a acceptée dans son laboratoire sans poser de questions, qui m'a encouragée à explorer mes hypothèses de travail et dont la porte était toujours grande ouverte. Je tiens à vous dire à quel point j'ai apprécié travailler avec vous durant toutes ces années. Merci pour votre écoute et votre disponibilité!

Merci à tous les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé d'innombrables cafés, discussions et réflexions. À Sam, qui a su égayer mes journées avec son humour pince-sans-rire de quatrième niveau et ses douteux choix musicaux, de Joe Dassin à Noël dans la rue. À Karine, un exemple de rigueur scientifique dont je jalousais les lunches à la Ricardo. À Laurent, qui semble toujours ébahi de voir comment ça marche dans ma tête; tu es mon meilleur public. Merci à mes vieux mentors Furax et George, qui m'ont montré comment naviguer dans un laboratoire, et à Demian, qui avait toujours son petit grain de sel à ajouter. À Frédérique et Céline, pour leur aide si précieuse. À Louise, qui est toujours là quand on a besoin d'elle, que ce soit dans la salle de cultures ou sur une île déserte! À Monique et Mireille pour leur constant et apprécié soutien.

Merci à Fred et Mathieu, qui ont su mettre de la vie dans notre labo malgré leur interdiction de séjour. C'est d'ailleurs grâce à toi Fred si j'ai publié mon premier article, celui qui révélait le secret de la Caramilk! Quant à Mathieu, je me souviendrai toujours de toi pour ton gros... immense... gigantesque... sens de l'humour. Sans oublier ton courage légendaire.

Merci à grand-papa, un bâtisseur, un exemple de persévérance qui m'a toujours bien conseillée. À Nicole, qui m'a guidée, elle qui comprend bien les aléas de la vie d'étudiante au doctorat. À Ari, une fille brillante et adroite. Plus une amie qu'une cousine. Une oreille, une épaule. Et à toute la famille Maher.

Merci à Nini, ma plus grande fan, dont les encouragements me font le plus grand bien et les prières me portent chance. Et quand j'ai besoin d'un petit moment de répit, c'est à ta porte que je cogne. Un thé, ton divan, ta compagnie et me revoilà prête à braver mon tourbillon quotidien. Merci à Dodo, ma fée marraine, toi qui as toujours mon bonheur à cœur. À Jacques-Bernard, qui a le don de pousser mes réflexions toujours plus loin. À Stéphane, celui qui m'a appris qu'en redoublant d'ardeur, « sky's the limit »! À Marie-Pier, un exemple de don de soi, mais surtout, une amie qui m'est chère.

À mes petites sœurs que j'aime de tout mon cœur. Jojo la lunatique, celle qui fait toujours rire, pour sa naïveté et sa façon candide de voir la vie. Gabette la fonceuse, la courageuse, la charmeuse, celle qui sème la joie autour d'elle. Val, merci d'être restée au New-B! Ha ha! Mais non. Malgré ton caractère, je t'aime beaucoup!

Je remercie mes parents, qui ont toujours été là pour moi. Sur qui je peux compter sans la moindre hésitation. Qui m'encouragent peu importe mes choix et qui doivent être les seuls parents du monde à avoir hâte que leur enfant décroche! Qui sont une intarissable source d'inspiration pour moi, pour leur passion dans tout ce qu'ils entreprennent et leur générosité sans borne. En sciences, il faut penser autrement et pour cela je te dis merci maman! À mon père, qui m'a pavé la voie et dont je suis fièrement les traces. Je vous aime!

Merci à Yannick, mon ami, mon chauffeur de taxi, mon amoureux, ma petite sirène, mon complice de tous les jours, sans qui cette thèse aurait tout simplement été illisible. Merci pour ta compréhension, ton soutien. Tes petites attentions qui me vont droit au cœur!

Et merci à tous mes amis, grâce à qui mon quotidien n'est jamais ennuyeux. À ma gang du labo: Mélisa, Véro, Élise, Xavier, Guillaume (Haha tu vas rire). À ma gang de médecine: Daphné et P-A (qui savent de quoi je parle), Gen (un jour ce sera à ton tour, lâche pas), Xue (aka la folle), François, Dragosh, Élise, Jean-Philippe. À mes amies du New-B, maintenant aux quatre coins du Canada, mais qui occupent toujours une grande place dans mon cœur: Mel (la fille la plus drôle au monde), Lydia, Lise, Julie, Amy, Parise.

À Patricia, ma source d'énergie, de divertissement constamment renouvelé. À Cat, celle qui ne se laisse pas marcher sur les pieds et grâce à qui la vie me coûte cher: sushi, tartare, champagne et bottes la Canadienne! Et bien sur à son complice Tanguy et à sa sœur Marie-Claire, qui font maintenant partie intégrante de ma vie.

Mille mercis à vous tous d'être dans ma vie, de m'encourager, de m'endurer et de m'inspirer!

INTRODUCTION

1. Complexes ribonucléoprotéiques (mRNP)

Il existe au sein de la cellule de nombreux complexes ribonucléoprotéiques participant aux divers aspects de la régulation post-transcriptionnelle des ARNm. Dans cette section, nous aborderons la théorie des régulons, ferons un léger survol des divers complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la régulation de la traduction et introduirons diverses études de mRNP effectuées à l'aide des techniques de spectrométrie de masse et/ou de micropuces. Ceci nous permettra de mettre en perspective les diverses études de caractérisation des mRNP de Staufen abordé dans les prochaines sections.

1.1. La théorie des régulons d'ARNm

Nous avons longtemps cru que la transcription de l'ARNm était l'unique lieu de la régulation de l'expression génique. Une fois transcrit, l'ARNm se voit traduit et le produit protéique effectue son rôle au sein de la cellule. Nous savons maintenant qu'il existe une myriade de mécanismes permettant la régulation de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel. Ceux-ci font entrer en ligne de compte des éléments en *cis* présents au sein même de l'ARNm et des facteurs protéiques agissant en *trans*. La cellule peut ainsi modifier précisément la traduction, la dégradation et la localisation d'ARNm nécessaires lors de phénomènes tels que l'homéostasie, la régulation métabolique, l'adaptation aux facteurs de stress en passant par la différenciation et la division cellulaire ou encore le remodelage synaptique (Keene and Tenenbaum 2002; Keene 2007).

Afin de contrôler le sort de leur transcrit, les protéines liant l'ARN (RBP) doivent pouvoir reconnaître leur substrat à l'aide de leurs différents domaines de liaison à l'ARN. Pour ce faire, les ARNm possèdent des séquences et/ou des structures d'ARN particulières distribuées en un endroit bien précis le long de leur séquence nucléotidique. Nous décrivons ces arrangements comme étant des éléments en *cis*. Ceux-ci leur permettent d'être reconnus par divers facteurs agissant en *trans*, pouvant lier ces éléments d'ARN. Ainsi, une fois

transcrit, l'ARNm se retrouve associé à plusieurs protéines formant un complexe ribonucléoprotéique qui se modifiera au fil du temps lors de son cheminement à travers les différentes voies de régulation de l'ARN telles que l'épissage, l'export nucléaire en passant par la traduction ou encore la dégradation de l'ARNm. L'ajout d'une protéine et le départ d'une autre permettront à ce complexe remodelé de modifier son rôle auprès de l'ARNm lors des diverses étapes qu'il devra rencontrer (Keene and Tenenbaum 2002; Keene 2007).

L'ampleur de la régulation post-transcriptionnelle est d'autant plus grande que différents ARNm, agissant au sein d'un même mécanisme cellulaire, peuvent arborer le même élément *cis*. Ils peuvent donc voir coordonner leur destin suite à la modification post-traductionnelle du facteur protéique agissant en *trans*. De plus, un même ARNm peut posséder plusieurs structures et/ou séquences de reconnaissance différentes lui permettant ainsi d'être régulé par de nombreux facteurs selon l'état de la cellule. Il est important de souligner l'existence d'autres facteurs pouvant agir en *trans* tels les miRNA ou certains métabolites (Keene and Tenenbaum 2002; Keene 2007).

Ce mécanisme permettant de réguler dans le temps et dans l'espace une population d'ARNm nécessaire à la mise en place d'un même phénomène est appelé « la théorie des régulateurs d'ARN ».

En plus de coordonner le sort d'une population d'ARNm, la modification s'opère beaucoup plus rapidement de cette façon que si la cellule devait d'abord transcrire ces ARNm avant de les traduire ou encore attendre la dégradation d'un ARNm possédant une longue demi-vie au lieu de l'induire directement.

De même, lors du remodelage synaptique, de la différenciation et de la division cellulaire, la localisation de certaines protéines est primordiale. Il est beaucoup plus simple de traduire localement ces transcrits que de transporter chaque protéine traduite immédiatement à la suite de la transcription de l'ARNm. De plus, il faudra réprimer leur fonction au cours du transport.

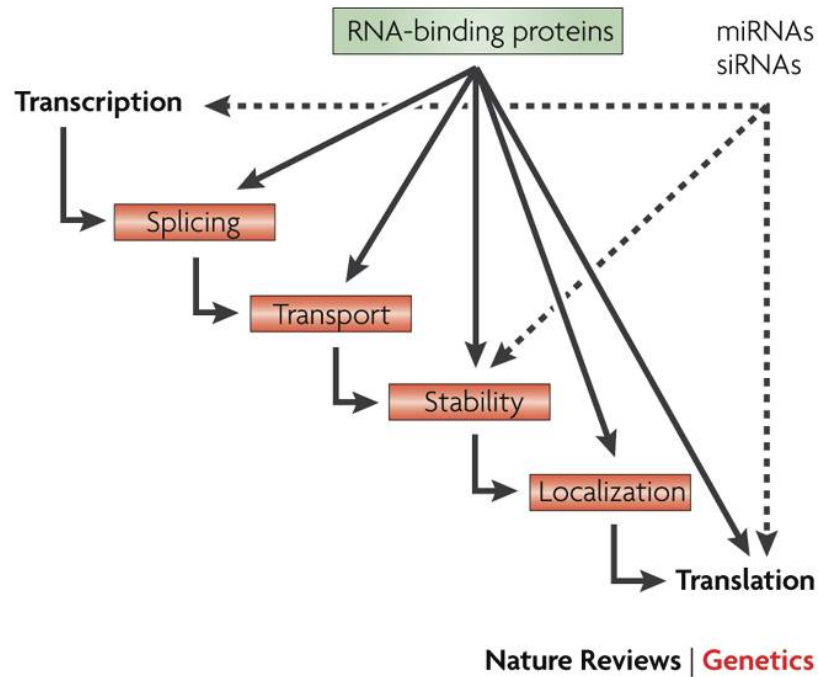


FIGURE 1 : Interrelation entre les différentes voies de régulation post-transcriptionnelle

Dans les cellules eucaryotes, les ARNm traversent de nombreuses voies de régulation post-transcriptionnelle. Plusieurs facteurs peuvent coordonner ce cheminement, dont les protéines liant l'ARN et les petits ARN non-codant, tels les miRNA et les siRNA. (Keene 2007)

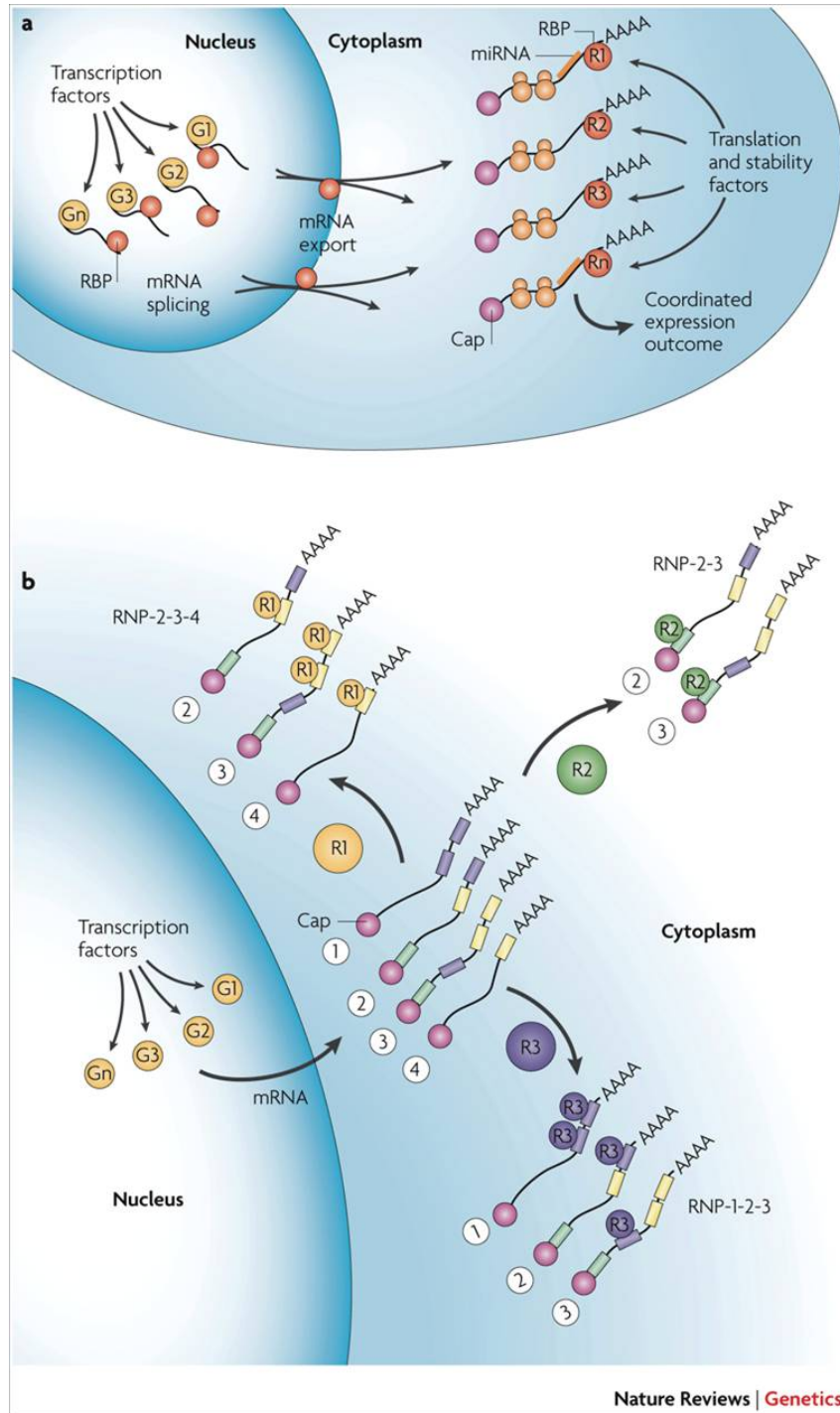
FIGURE 2 : Régulation post-transcriptionnelle coordonnée de différentes sous-populations d'ARNm, selon les facteurs auxquels elles sont associées

A) Divers facteurs de transcription, G1 à Gn, régulent la transcription de sous-catégories de gènes. Concomitant à leur transcription, les ARNm naissant s'associent à différentes protéines liant l'ARN (RBP : R1 à Rn) permettant leur épissage ainsi que leur export nucléaire spécifique. Le sort des divers ARNm est régulé par les divers facteurs auxquels ils s'associent, RBP, miRNA, etc. La combinaison de ces facteurs forme un régulon d'ARN. Les divers régulons induisent la coexpression de différentes populations d'ARNm participant à une même voie métabolique via la stabilité, la traduction, la dégradation et le transport des transcrits auxquels ils s'associent.

B) Exemple de différents régulons d'ARN à l'aide de trois RBP, R1 à R3, et de quatre transcrits d'ARNm numérotés de 1 à 4. Un même transcrit peut être régulé différemment selon les facteurs auxquels il s'associe. Chaque régulon permet l'expression coordonnée des ARNm auxquels il s'associe. Mentionnons qu'il est possible pour un ARNm d'être lié par plus d'une protéine.

(Keene 2007)

FIGURE 2



1.2. Introduction aux divers complexes ribonucléoprotéiques responsables de la régulation traductionnelle

Il est facile de se perdre dans les définitions et la composition des multitudes de complexes protéine-ARN impliqués dans la régulation traductionnelle de l'ARNm tels les granules d'ARNm, les particules de transport, les polysomes, les granules de stress, les P-bodies ou encore le complexe RISC. En effet, plusieurs protéines font partie de plusieurs types de complexes à la fois. Il en est de même pour les différents ARN qui peuvent transiter d'un complexe à l'autre de façon dynamique. De plus, plusieurs fonctions sont communes aux divers mRNP.

Comme nous tentons de mieux comprendre ce qui caractérise les complexes ribonucléoprotéiques de Stau et que celle-ci fut retrouvée au sein de plusieurs des complexes mentionnés ci-haut, nous ferons une brève caractérisation de quelques-uns de ces mRNP. Nous discuterons de certaines interrelations existant entre les divers complexes ainsi que de l'implication de Stau. Et comme nous nous intéressons particulièrement aux complexes neuronaux de Stau, nous mettrons l'emphase sur certains mécanismes impliqués dans la régulation traductionnelle au cours du processus de localisation dendritiques d'ARNm. Cependant, nous discuterons de ce mécanisme plus en détail dans la section 2.

1.2.1. Les miRNA et le complexe RISC

Certains ARNm peuvent être réprimés par la voie des micro-RNAs (Cai, Yu et al. 2009; Fabian, Sonenberg et al. 2010). Les miRNA sont de petits ARN non-codant d'environ 21 nucléotides, pouvant se lier à une séquence relativement complémentaire située à l'extrémité 3'UTR de l'ARNm, et ce, au sein d'un complexe appelé RISC (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

Plusieurs protéines font partie de ce complexe, telles les protéines GW182, PABPC, les protéines du complexe de déadénylation CAF1, CCR4, le complexe NOT, ainsi que la protéine DCP2, laquelle enlève la coiffe, de même que ses activateurs DCP1, EDC4 et DDX6. Cependant, la composante clé du complexe RISC est la protéine Argonaute. (Huntzinger and Izaurralde 2011)

La majorité des miRNA sont des produits de la polymérase II. Ils sont d'abord transcrits sous forme de précurseur appelé pri-miRNA (Lee, Kim et al. 2004). Celui-ci adopte une forme en tige boucle avec une longue extrémité non appariée. Cette extrémité sera clivée dans le noyau par Drosha, une protéine de la famille des RNase III, afin de former une tige boucle d'environ 70 nt (Lee, Ahn et al. 2003). La première étape de la maturation du précurseur est alors terminée et celui-ci est maintenant appelé pré-miRNA. Ce transcrit peut alors être exporté du noyau et la deuxième étape de maturation peut s'amorcer. Encore une fois, l'acteur principal est une RNase III appelée Dicer et qui aura comme mandat de cliver la boucle afin de former un duplex d'ARN d'environ 20-24 nt (Bernstein, Caudy et al. 2001). Seul l'un des deux brins sera incorporé dans le complexe. Il sera appelé brin guide alors que l'autre est appelé brin passager. Plusieurs déterminants participent au choix du brin guide, mais il semble que le principal facteur soit la stabilité de l'extrémité 5', c'est-à-dire que le brin dont l'extrémité 5' est la plus instable sera choisi comme guide (Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Le complexe RISC contient plusieurs protéines dont la composante clé fait partie de la famille des protéines Argonaute. La nature de la protéine Argonaute ainsi que le pourcentage d'appariement entre le miRNA et l'ARNm détermineront la fonction du complexe RISC, soit la répression vs la dégradation de l'ARNm cible (Czech and Hannon 2011).

En effet, il existe plusieurs hypothèses et controverses quant au mode d'action de ces miRNA. Certains résultats semblent montrer qu'ils agissent au niveau de l'initiation de la traduction alors que d'autres concluent, au contraire à une implication au niveau de

l'élongation (Fabian, Sonenberg et al. 2010). Les miRNA seraient également impliqués dans la dégradation de certains ARNm (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

Chez la drosophile, dStau colocalise avec Argonaute, suggérant ainsi une interrelation entre les complexes de transport neuronal et la répression traductionnelle induite par le complexe RISC (Barbee, Estes et al. 2006).

1.2.2. Les P-bodies

Les P-bodies (processing bodies), aussi connus sous le nom de GW (glycine- et tryptophan- rich cytoplasmic processing bodies) et de DCP bodies (Dcp containing bodies), sont traditionnellement reconnus comme étant des sites de dégradation exonucléotidique, de 5' vers 3', d'ARNm (Sheth and Parker 2003; Cougot, Babajko et al. 2004). Ils contiennent entre autres les protéines des complexes LSm1-7 et Dcp 1/2 responsables d'enlever la coiffe, l'exonucléase XRN1 qui dégrade l'ARNm de 5' vers 3', la protéine de déadénylation CCR4, les protéines GW182 et Ago2 responsables de la répression/dégradation d'ARNm par les miRNA ainsi que certaines composantes du NMD, SMG5 et SMG7. Le NMD est un mécanisme de dégradation que nous aborderons dans la section 3.6.1.

Ces complexes sont donc également impliqués dans la dégradation d'ARNm par les miRNA, ainsi que dans le transport et la stabilité des ARNm (Moser and Fritzler 2010). En effet, nous savons que les P-bodies peuvent également être des sites de répression traductionnelle où les ARNm qui y sont présents peuvent retourner en traduction une fois la levée de l'inhibition (Bregues, Teixeira et al. 2005). Contrairement à certains autres complexes ribonucléoprotéiques, comme les granules d'ARN par exemple, les P-bodies ne contiennent aucun ribosome. Les ARNm présents sont donc réprimés au stade de l'initiation de la traduction (Teixeira, Sheth et al. 2005).

La présence de Stau au sein des PB n'est pas encore claire. En effet, chez la drosophile, dStau fut retrouvée en complexe avec les protéines du P-bodies Dcp1p et

Xrn1p/Pacman (Barbee, Estes et al. 2006). Cependant, ce ne fut pas le cas au sein des neurones de mammifères. En effet, aucune colocalisation entre les marqueurs du PB (Rck, DCP1) et ceux des complexes de transport (rStau1, mStau2, Btz, ZBP1) ne fut observée. De plus, des études d'immunoprécipitation de Stau1 et Stau2 n'ont pas permis de détecter la protéine DCP1 (Zeitelhofer, Karra et al. 2008).

Il semble cependant exister une relation dynamique entre les PB et les complexes de transport. Environ 50% des PB sont retrouvés à proximité des complexes de transport et une dissociation est induite suite à l'activité synaptique. En fait, l'activité synaptique diminue de 60% la présence de PB au niveau dendritique (Zeitelhofer, Karra et al. 2008). Ce qui suggère une interrelation entre les ARNm transportés aux dendrites, par les particules de transport, la répression traductionnelle via les PB et la levée de l'inhibition traductionnelle par l'activité synaptique (Barbee, Estes et al. 2006; Hillebrand, Barbee et al. 2007).

Il existe également un lien étroit entre les PB et le complexe RISC, représenté par la protéine Argonaute. Celle-ci, de même que certains ARNm ciblés par les miRNA pour être réprimés, sont retrouvés au sein des PB (Liu, Valencia-Sanchez et al. 2005).

1.2.3. Les granules de stress

D'ordre général, les granules de stress (SG) sont des complexes permettant la répression traductionnelle au sein de la cellule lors d'une agression. Cependant, dans les neurones, ces complexes peuvent exister à l'état normal. Dans les SG, on retrouve entre autres les protéines TIA-R, TIA-1 et G3BP pouvant former des multimères et donc, de ce fait, des agrégats, de même que la présence de la petite sous-unité ribosomique et certains facteurs d'initiation tels PABP, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B eIF4E et eIF4G (Bramham and Wells 2007; Balagopal and Parker 2009). Cependant, la grande sous-unité du ribosome n'est pas présente (Bramham and Wells 2007).

C'est principalement l'inhibition de la traduction, initiée par la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α , qui provoque la formation de ces complexes. Une fois le stress terminé ou encore suite à l'induction de la LTP, eIF2 α se trouve sous forme déphosphorylée et par conséquent, les ARNm sont libérés du complexe et retournés à un état de traduction active. La potentialisation à long terme ou LTP est la conséquence d'une force d'association synaptique consolidée. Nous en discuterons plus en détail dans la section 2.5.1. Les ARNm présents dans les granules de stress peuvent également être acheminés aux P-bodies afin d'être dégradés (Sossin and DesGroseillers 2006).

Stau1 et Stau2 forment des granules d'environ 500 nm de diamètre dans le corps et les prolongements membranaires de myéline de l'oligodendrocyte. Ils y sont retrouvés en association avec les polysomes. Lorsque ceux-ci sont détruits, suite à l'ajout de la puromycine, Stau1 et Stau2 sont redistribuées de leurs granules distaux vers les régions plus proximales où elles forment alors des complexes de plus grandes tailles, 2 à 5 μ m (Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). Le stress oxydatif induit la formation du même genre de granule, que l'on identifie comme étant des SG par la présence du marqueur TIAR.

Ce stress induit un changement similaire dans la distribution des ARNm poly(A). Cependant, mentionnons que la distribution des transcrits nouvellement synthétisés n'est pas affectée (Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). Ceci suggère que Stau soit important lors des étapes tardives de la localisation dendritique. Il faut souligner que dans ces complexes, Stau1 et Stau2 colocalisent fortement alors que, normalement, ils sont retrouvés en association uniquement dans 15% des cas.

Finalement, il est intéressant de constater qu'en l'absence de Stau1, la formation de SG se trouve facilitée alors qu'inversement, lorsqu'elle est surexprimée, il y a abolition de la formation de ces complexes. La région responsable de cet effet se situe dans la région N-terminale capable de lier les polysomes (Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). Il existe un équilibre entre les polysomes et les SG. En effet, la stabilisation des polysomes diminue la

formation des SG et, inversement, leur déstabilisation la favorise. Ce qui suggère que Stau1 aurait un rôle à jouer dans la stabilisation des polysomes lors d'un stress quelconque et abolirait ainsi la formation des SG ou encore favoriserait leur dissolution (Thomas, Tosar et al. 2009).

1.2.4. Les particules et granules de transport

Les particules et granules de transport sont des complexes qui, comme leurs noms l'indiquent, sont impliqués dans le transport d'ARNm, notamment au niveau neuronal. Les protéines les plus fréquemment étudiées au sein de ces complexes neuronaux sont sans aucun doute les protéines Staufen, FMRP et ZBP1. Chacune formant des complexes de transport distincts. De plus, les particules et granules de transport comprennent bien entendu un moteur moléculaire, des protéines nécessaires à la répression de l'expression de l'ARNm, des facteurs de traduction, ainsi que diverses protéines liant ou non l'ARN, dont les rôles restent encore à être déterminés. Cependant, il est important de préciser que les particules ne contiennent aucun ribosome. La traduction s'en trouve donc inhibée au niveau de l'initiation. Au contraire, les granules d'ARN eux contiennent des ribosomes. Malgré la présence de ceux-ci, la traduction se trouve toujours inhibée, probablement au niveau de l'élongation (Sossin and DesGroseillers 2006). Les granules d'ARNm sont de plus gros complexes que les particules et leur motilité est plus restreinte.

La présence de protéines du complexe de jonction exon-exon au sein des particules de transport est une autre indication que la répression de l'ARNm peut être induite au stade de l'initiation de la traduction. En effet, même la ronde pionnière de traduction n'a pas encore eu lieu car celle-ci aurait déplacé les protéines du complexe exon-exon de l'ARNm.

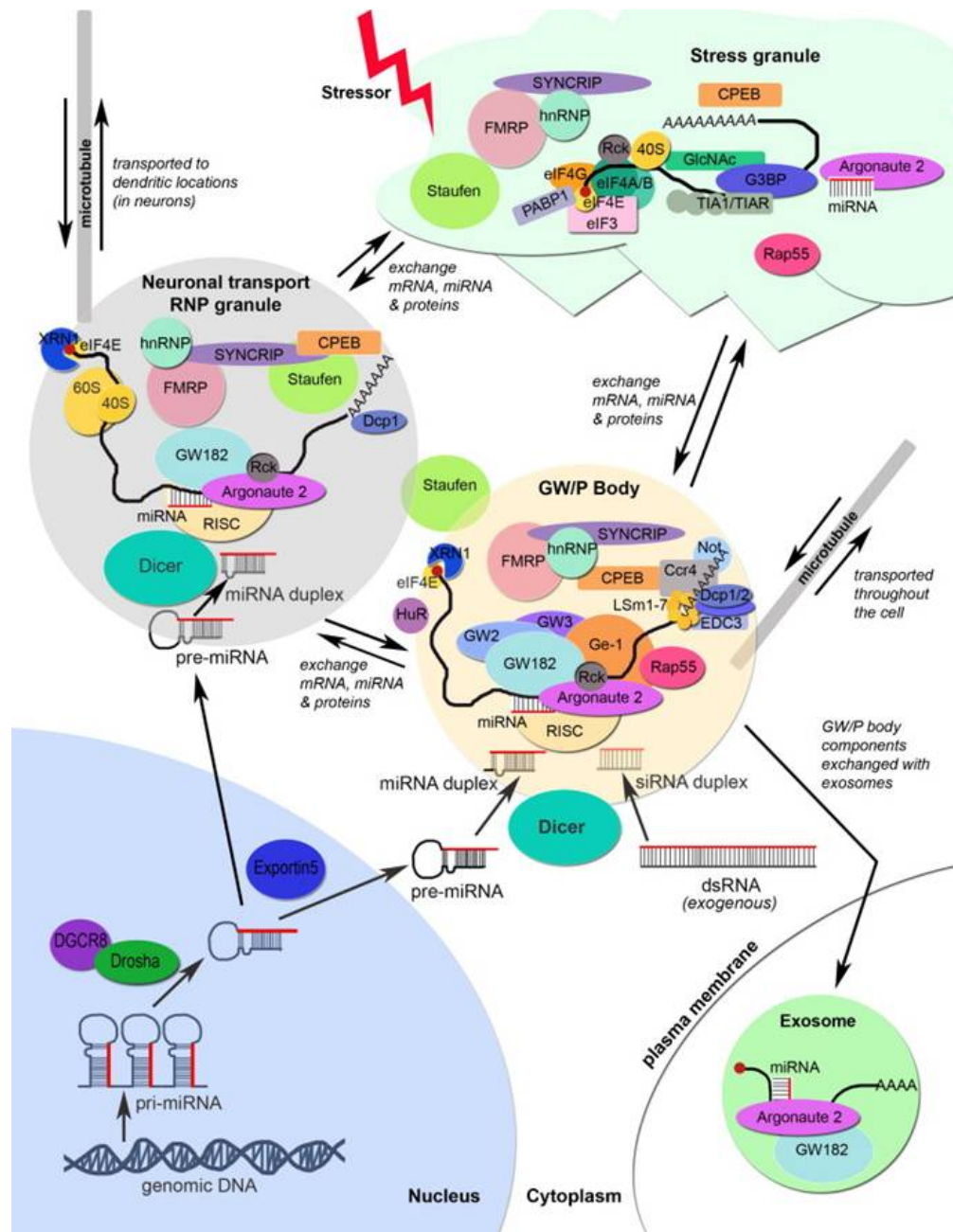


FIGURE 3: Modèle conceptuel d'une cellule de mammifère démontrant l'interrelation entre les P-bodies, les granules de stress et les mRNP de transport
(Moser and Fritzier 2010)

Au contraire, ces protéines n'ont pas été identifiées au sein des granules de transport. Les granules d'ARN seraient en fait des sites d'entreposage d'ARNm qui, une fois activés, se déploieraient afin de permettre la traduction des ARNm présents, et ce, sous forme de polysome actif en traduction (Krichevsky and Kosik 2001; Sossin and DesGroseillers 2006). Comme nous l'aborderons dans la section 3.3.2, Stau fut retrouvée en association avec les polysomes à de nombreuses reprises.

Nous discuterons plus en détail des autres distinctions à faire entre les particules et les granules de transport dans la section 5.1. De plus, nous discuterons du rôle de Stau au niveau de la traduction dans la section 3.5.

1.3. Caractérisation de complexes ribonucléoprotéiques

Nous aborderons dans cette section quelques études de caractérisation de complexes ribonucléoprotéiques ayant employé les techniques de protéomique et de micropuces d'ADN afin d'identifier les partenaires protéiques ainsi que les ARNm associés à diverses protéines d'intérêt. Ainsi, nous pourrions mettre en perspective les résultats obtenus de même que les techniques utilisées lors de la caractérisation des mRNP de Stau.

1.3.1. Analyses protéomiques de complexes ribonucléoprotéiques

Afin d'identifier les partenaires protéiques associés à une protéine d'intérêt, il est possible d'isoler celle-ci ainsi que les facteurs qui lui sont associés par la technique de co-immunoprécipitation. L'immunoprécipitation (IP) consiste à utiliser un anticorps spécifique à une protéine d'intérêt afin de l'isoler des autres composantes d'un extrait cellulaire. La stringence dans laquelle est effectuée l'IP peut permettre d'isoler certains facteurs associés à la protéine d'intérêt, tels des ARNm ou encore des partenaires protéiques. Nous parlons alors de co-immunoprécipitation. Nous procédons ensuite à

l'identification des protéines présentes dans l'immunoprécipité par analyse en spectrométrie de masse. Nous avons ainsi procédé afin d'identifier les partenaires potentiels de Stau2. Voici quelques exemples d'études ayant procédé de la même façon et qui font intervenir Staufen d'une façon ou d'une autre.

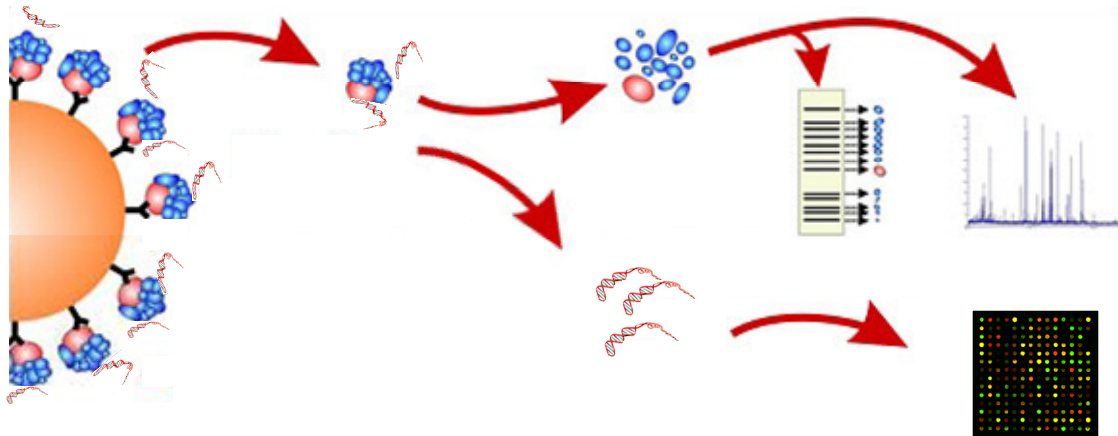


FIGURE 4 : Coimmunoprécipitation et identification des diverses composantes d'un mRNP

Coimmunoprécipitation d'une protéine d'intérêt (en rouge), à l'aide d'un anticorps spécifique à celle-ci, et des composantes qui lui sont associées, suivie de l'identification des facteurs protéiques (en bleu) et des transcrits d'ARNm par spectrométrie de masse et micropuces d'ADN, respectivement.

1.3.1.1.KIF5

La kinésine est une protéine qui se déplace le long des microtubules. Elle agit comme moteur moléculaire et permet ainsi le transport de divers complexes. Elle est formée de deux chaînes lourdes (KHC ou KIF5) et de deux chaînes légères (KLC). En fait, il s'agit d'une famille de protéines comprenant plus de 45 membres chez les mammifères (Hirokawa and Takemura 2005).

Isoler les protéines associées à ce moteur fut le point de départ d'une équipe de chercheurs voulant identifier certains facteurs clé présents au sein d'un complexe de transport. Les protéines présentes furent isolées à partir d'un lysat de cerveau de souris ajouté à une colonne d'affinité arborant KIF5-GST. Dix-sept protéines furent identifiées à l'aide de l'immunobuvardage de type western et 34 par analyse protéomique 2D-MS/MS. Ainsi, 42 protéines furent identifiées au total au sein d'un complexe de plus de 1000S correspondant vraisemblablement à un granule d'ARN. Un domaine minimal de liaison (MBS) de 59 aa, situé dans la queue de la protéine KIF5, fut identifié (Kanai, Dohmae et al. 2004). Comme cette région permet l'association à toutes les protéines, il semble plus probable qu'un complexe, ayant comme point d'ancrage cette région, fut isolé plutôt que plusieurs protéines associés à divers domaines de KIF5.

Les auteurs identifièrent des protéines de transport (FMR1, FXR1, FXR2, Pur α , Pur β , staufen1), des facteurs de traduction (EF-1 α , eIF2 α , eIF2 β , eIF2 γ , Hsp70, ribosomal protein L3), des hnRNPs (hnRNP-A/B, hnRNP-A0, hnRNP-A1, hnRNP-D, hnRNP-U), des hélicases (DDX1, DDX3, DDX5), des protéines liant l'ARN (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6, ALY, cold inducible RNA binding protein, EWS, NonO, Nucleolin, paraspeckle protein 1, PSF, RNA 3'-terminal phosphate cyclase, RNA binding motif protein 3, SYNCRIP, TLS) et autres (Ser/Thr kinase receptor associated protein, TRIM2, TRIM3, CGI-99, FLJ38426, HSPC-117, zfp385, 2610528C06Rik, 5730436H21Rik, 6720458F09Rik). Alors que les marqueurs du complexe d'épissage, U1snRNP-70, du reticulum endoplasmique,

Bip, et des vésicules synaptiques, p38, ne furent point retrouvés dans le complexe (Kanai, Dohmae et al. 2004).

Cependant, la très grande majorité de ces interactions furent abolies par l'ajout de RNase, ce qui suggère une très grande importance des transcrits d'ARN dans la formation du complexe. De plus, la majorité de ces interactions résistèrent à l'ajout de l'ARNt et d'héparine, ce qui indique que ces liaisons protéine-ARN semblent spécifiques. Enfin, ils identifièrent via RT-PCR la présence des ARNm de *CaMKII α* et *Arc*, deux ARNm localisés dans les dendrites, mais non ceux de *GAPDH* et de l' *α -tubulin* (Kanai, Dohmae et al. 2004).

En terminant, Stau1 semble être associée à de nombreux facteurs protéiques au niveau neuronal. En effet, Stau1 fut également isolée suite à l'immunoprécipitation des protéines KIF5, hnRNP-U, Pur α , Pur β , PSF, NonO, DDX1, CGI-99 et EF-1 α . Cependant, encore une fois, la majorité de ces interactions furent abolies en présence de RNase (Kanai, Dohmae et al. 2004). Des études de colocalisation confirmèrent la présence de Pur α au sein des complexes de Stau1.

1.3.1.2. mRNP traduit vs non traduit

Les ARNm présents dans les neurones peuvent se retrouver sous forme de complexe actif ou inactif en traduction. Afin de mieux comprendre cette dynamique, l'équipe du Dr. Greenough se proposa d'identifier les protéines présentes spécifiquement dans chacun de ces complexes. Ainsi, elle isola les protéines présentes uniquement dans les fractions de polysomes actifs ainsi que celles, au contraire, présentes seulement dans les fractions de complexes inactifs en traduction.

Les complexes ribonucléoprotéiques furent séparés sur gradient de sucrose, en trois catégories selon l'absence de ribosome (fraction1), la présence de la petite et/ou de la grande sous-unité ribosomale (fraction2) et finalement selon la présence de polysomes (fraction3). Les ARNm poly(A) présents dans chacune de ces fractions furent ensuite isolés

par chromatographie d'affinité sur une colonne de cellulose associée à l'oligo(dT), puis les protéines associées à ces ARNm furent identifiées par nano-HPLC- μ -electrospray ionization-MS (Angenstein, Evans et al. 2005). Ils se concentrèrent par la suite sur les protéines présentes dans les fractions 1 et 3, représentant les ARNm silencieux et traduits, respectivement.

Les protéines enrichies dans les **fractions d'ARNm non-traduits** incluent les protéines impliqués dans la stabilité de l'ARNm (FUSE-binding protein 1, HSC-70, UNR), le transport (dynéine), la localisation d'ARNm (EWS), la traduction (UNR), la polyadénylation (hnRNPH1), la transduction du signal (phosphofructokinase C, STRAP, EWS), le remodelage d'ARN (hnRNPH1, EWS) et autres (chaîne lourde de clathrine, G3PD, MAP1b).

Les protéines préférentiellement associées aux **ARNm de la fraction polysomale** incluent les protéines avec des rôles dans la stabilité de l'ARNm (HuB, HuC, interleukin enhancer-binding factor 3, PAI-1, Regulator of nonsense transcripts 1), la localisation d'ARNm (Staufen2, YB1, YB2), le contrôle de la traduction (FMRP, YB1), la polyadénylation (U2 small nuclear RNP auxiliary factor 1, U2 small nuclear RNP auxiliary factor 2), la transduction du signal (interleukin enhancer binding factor 3, protein activator of the interferon-induced protein kinase, RACK1), le remodelage de l'ARN (similar to Srm300, similar to splicing factor arginine/serine-rich 3, U2 small nuclear RNP auxiliary factor 2, YB1, DEAH box polypeptide 30 isoform 2, similar to RNA helicase A) et autres (apoptotic chromatin condensation inducer 1, SiahBP). Il est possible cependant que certaines de ces protéines soient associées à de gros complexes qui ne soient pas en lien avec les polysomes. En effet, Staufen et FMRP demeurent dans la fraction 3 malgré la dissolution des polysomes.

Le rôle et la régulation de certaines protéines identifiées, telles le complexe STRAP-UNR, EWS, CamKII, G3BP2a, RACK1, PACT, suggèrent des mécanismes de contrôle traductionnel très intéressants. Par exemple, STRAP et UNR interagissent de façon ARN-

indépendante. La capacité d'UNR de lier les sites d'entrée interne du ribosome (IRES) et celle de STRAP de pouvoir interagir avec un récepteur de la famille des sérine/thréonine kinase suggère un mécanisme permettant la levée de l'inhibition de la traduction lors de l'activation du récepteur à la synapse. Une deuxième hypothèse suggérée est la fonction d'EWS dans le maintien sous forme inactive de certains ARN. D'une part, par le fait qu'elle fut identifiée dans le complexe sans ribosome, de l'autre, parce qu'elle a la capacité d'être phosphorylée par la protéine PKC, modification qui réduit sa capacité de lier l'ARN. Ainsi, ce mécanisme permettrait la traduction des ARNm liés par EWS une fois la cascade signalétique activant PKC enclenchée par l'activité synaptique. De plus, dans ces deux fractions, ils isolèrent, entre autres, l'actine et les chaînes α et β de la tubuline suggérant une association étroite entre les mRNP et le cytosquelette.

1.3.1.3. IMP1

La protéine IMP1 est l'orthologue de ZBP1, la protéine responsable de la localisation de l'ARNm de la *actin- β* à l'extrémité mouvante du fibroblaste ainsi que dans le compartiment dendritique des neurones (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Afin de mieux comprendre le rôle d'IMP1, les auteurs ont tenté d'identifier les partenaires protéiques ainsi que les ARNm présents au sein des complexes ribonucléoprotéiques de la protéine (Jonson, Vikesaa et al. 2007). Pour ce, faire une lignée cellulaire stable exprimant IMP1-FLAG sous le contrôle du promoteur de la tétracycline fut produite dans les cellules HEK293 (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Staufen et FMRP sont deux protéines dont la propriété de former des complexes ribonucléoprotéiques neuronaux est connue. Les auteurs ont donc voulu savoir, entre autres, si celles-ci étaient présentes au sein des granules d'IMP1. Une étude de coimmunoprécipitation fut alors effectuée et les résultats indiquèrent que ni l'une ni l'autre de ces deux protéines n'était associée avec IMP1. IMP1 est également exclu des P-bodies et des granules de stress (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Une étude de protéomique fut entreprise à la suite de la purification par affinité de la protéine IMP1-FLAG. La protéine ERG1-FLAG fut utilisée comme contrôle négatif. Vingt-trois protéines furent ainsi identifiées dont PABP1 et YB1. En fait, la majorité des protéines identifiées appartiennent à la famille des protéines liant l'ARN dont plusieurs hnRNPs tels hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP D, hnRNP L, hnRNP Q, hnRNP R, et hnRNP U. On retrouve également NFAR2, NFAR3, PABP2, PABP4, nucléoline, hélicase A, CBP80, plusieurs protéines de la petite sous-unité ribosomique ainsi qu'une seule protéine de la grande sous-unité, P0. De plus, aucune protéine du cytosquelette, de la matrice nucléaire ou du complexe d'épissage ne fut identifiée (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

La présence de facteurs de traduction additionnels, eIF4E, eIF4G, eIF2 α fut étudiée par immunobuvardage de type western. Cependant, ces protéines ne furent point retrouvées au sein du complexe d'IMP1. Au contraire, et avec cette même approche, les auteurs purent confirmer la présence de certains facteurs du complexe de jonction exon-exon UPF3B, Aly/REF, Y14, et eIF4AIII. De plus, la présence de l'ARNr 18S ainsi que l'absence de l'ARNr 28S fut confirmée par électrophorèse sur capillaire.

En conclusion, l'absence de facteur d'initiation de la traduction, la présence de CBP80, PABP2 de l'ARNr 18S et non du 28S ainsi que la présence de certaines protéines du complexe de jonction d'exon suggèrent que les ARNm se trouvent sous forme réprimée au sein des complexes d'IMP1, certains transcrits n'ayant pas même exécuté la ronde pionnière de traduction (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

1.3.2. Études par Micro Puce d'ADN des ARNm présents dans certains mRNP

De nombreuses techniques furent développées afin d'identifier les ARNm liés ou encore en complexe avec une protéine désignée, pensons à l'utilisation d'agents réticulants, au SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), à l'APRA

(l'amplification d'ARN par positionnement d'anticorps). Dans cette section, nous nous attarderons sur quelques études ayant utilisé comme approche l'immunoprécipitation de la protéine étudiée et l'identification, par micropuce d'ADN, des ARNm coimmunoprécipité. Cette technique appelée « RIP-Chip » fut choisie afin d'identifier les ARNm associés à Stau1 et Stau2.

En effet, d'une part la reconnaissance au niveau des sillons majeur et mineur d'une structure d'ARN double-brin ne permet pas à la protéine d'entrer en contact direct avec les bases nucléotidiques de l'ARN. Ainsi les techniques de réticulation chimique, à l'UV ou encore à l'aide de nucléotides photoréactifs, ne peuvent être utilisées, car lorsque la protéine d'intérêt interagit avec le squelette phosphodiester de l'ARN, les groupements réactifs de l'ARN ne sont pas en contact avec ceux de la protéine. Ce problème est rencontré avec la protéine Staufen qui s'associe à des structures double-brin d'ARNm. Mentionnons que le bleu de méthylène est un colorant cationique ayant la propriété de s'intercaler entre les paires de bases de l'ARN afin de permettre cette fois la réticulation de l'ARN double-brin avec la protéine qui lui est associée (Liu, Wilkie et al. 1996). Cependant, cette approche fut tentée au laboratoire dans le passé, mais sans succès.

D'autre part, l'approche par Selex est une approche *in vitro* permettant d'enrichir une sous-population d'ARN pour laquelle une protéine d'intérêt possède une grande affinité. Pour ce faire, une banque d'ARN possédant jusqu'à 1×10^{15} molécules uniques est mise en contact avec la protéine étudiée. Les ARN isolés sont ensuite reverse-transcrits, amplifiés et transcrits à nouveau en ARN. Cette nouvelle banque d'ARN est soumise une seconde fois à ce processus d'enrichissement afin de raffiner la population d'ARN identifiée. En fait, plusieurs rondes successives de cette technique seront effectuées avant d'identifier par séquençage la population finale d'ARN recueilli (Galarneau and Richard 2005; Hallegger, Taschner et al. 2006). Cette approche, aussi intéressante soit-elle, ne peut être utilisée afin d'identifier les ARNm cibles de Staufen, car *in vitro* Staufen ne possède aucune spécificité de séquence (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al.

1999). De plus, il ne s'agit pas de cibles cellulaires endogènes d'ARNm, mais bien d'une banque de séquences synthétiques d'oligonucléotides.

Enfin, la technique d'APRA permet d'identifier les ARNm qui sont en grande proximité avec la protéine d'intérêt. Elle consiste à relier de façon covalente à un anticorps, spécifique pour la protéine d'intérêt, un oligonucléotide possédant une région promotrice de même qu'une séquence dégénérée à son extrémité 3'. Ainsi, l'anticorps lié à la protéine étudiée permettra de rapprocher la séquence dégénérée de l'oligonucléotide aux ARNm situés à proximité de la protéine (Miyashiro, Beckel-Mitchener et al. 2003). Une reverse transcription *in vivo* peut alors être effectuée et les ADNc hybridés sur micropuce d'ADN afin d'identifier les ARNm présents. Cette approche est plus physiologique que la précédente. Cependant, il importe que l'anticorps soit très spécifique et que les nucléotides n'aient qu'une faible affinité de liaison. En effet, nous ne voulons pas que ceux-ci s'hybrident alors que l'anticorps n'a pas encore trouvé sa cible. Dans ce contexte, nous avons préféré nous en tenir à la technique du RIP-Chip qui nous permet de soustraire le bruit de fond à l'aide d'immunoprécipitation contrôlée.

1.3.2.1. HuB

Il existe quatre homologues de la famille des protéines ELAV/Hu chez les mammifères : HuA, HuB, HuC et HuD. Seule HuA est exprimée de façon ubiquitaire alors que les trois autres protéines sont majoritairement neuronales. Chacune d'elle possède trois domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM). Ce domaine permet la liaison d'un élément de régulation riche en AU appelé « ARE » et situé dans la région 3'-UTR de certains ARNm. En liant cet élément, les protéines Hu peuvent induire la stabilisation et la traduction d'un transcrit d'ARNm (Tenenbaum, Carson et al. 2000).

Cette étude fut l'une des premières utilisant la technique de RIP-Chip afin d'identifier les ARNm associés à une protéine particulière. Les auteurs étudièrent le contenu en ARNm de trois complexes ribonucléoprotéiques, soit ceux des protéines HuB,

PABP et eIF-4E. Ces complexes furent isolés à partir des protéines arborant un épitope g10 exprimées de façon stable dans la lignée cellulaire murine P19. La puce utilisée contenait 597 gènes murins.

HuB et eIF-4E furent toutes deux associées à 10% des ARNm sur la puce, chacune liant une population d'ARNm distincte. Au contraire, PABP semblait associée à tous les ARNm, ce qui n'est pas peu probable puisqu'elle est nécessaire à la traduction de tous les ARNm. En fait, on aurait pu croire qu'il en aurait été de même pour eIF-4E. Il est possible que dans ce cas, l'épitope ne fut pas accessible au sein de tous les mRNP (Tenenbaum, Carson et al. 2000).

De plus, les auteurs ont mis en évidence l'aspect dynamique de la composition des mRNP. Plusieurs études tendent à démontrer l'importance de la protéine HuB dans la différenciation neuronale. Les auteurs ont donc voulu voir si la population d'ARNm liée par HuB était modifiée suite à la différenciation neuronale des cellules P19 par l'acide rétinoïque. Comme prévu, 18 nouveaux transcrits furent alors retrouvés dans le complexe alors que trois transcrits en furent exclus ou diminués. De ces 18 transcrits, certains sont connus pour être régulés à la hausse suite à l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque (Tenenbaum, Carson et al. 2000). La différence entre les profils d'ARNm fut beaucoup plus faible lorsque l'expérience fut effectuée avec la protéine exprimée de façon ubiquitaire HuA. Le tout suggère que les complexes ribonucléoprotéiques sont dynamiques et se modifient selon l'état de la cellule (Tenenbaum, Carson et al. 2000).

1.3.2.2. Sam68

Sam68 est un facteur d'épissage ayant la capacité d'être exporté du noyau et d'être ensuite transporté dans le compartiment dendritique où il est retrouvé en association avec certains ARNm neuronaux. Son association avec les polysomes suggère qu'elle joue un rôle dans la traduction des ARNm localisés. De plus, la dépolarisation du neurone par le

KCl induit sa migration dendritique. Connaître les ARNm associés à Sam68 semble donc un point de départ intéressant afin de mieux comprendre son rôle au sein du neurone.

Pour ce faire, les auteurs immunoprécipitèrent Sam68 à partir d'un lysat de cortex de rat et utilisèrent un sérum pré-immun comme contrôle négatif. Les populations d'ARNm de ces deux immunoprécipitats furent reverse-transcrites et combinées à un agent fluorescent, le Cy3 ou le Cy5 selon le cas. L'hybridation fut ensuite exécutée sur la même puce NIA 15K contenant plus de 15 000 oligonucléotides. L'ARNm est considéré positif lorsque la fluorescence Cy3, correspondant à l'IP-Sam68, est plus élevée que celle du Cy5, correspondant à l'IP-Ctl. En fait, un score z est calculé à partir de chaque canal et un résultat entre 0.6 et 1.0 est considéré comme étant enrichi. Quarante-trois ARNm furent ainsi identifiés. Ils confirmèrent ensuite la présence de certains transcrits par RT-PCR (Grange, Belly et al. 2009).

Environ 20% des transcrits semblent impliqués dans la transduction du signal et un autre 20% dans le transport protéique. De plus, ces ARNm sont enrichis par rapport à leur représentation sur la micropuce. À l'inverse les transcrits associés à la régulation transcriptionnelle sont sous représentés. D'autres transcrits associés à Sam68 ayant des rôles dans l'exocytose, l'endocytose et dans la régulation du cytosquelette furent également identifiés. De façon très intéressante, plus du tiers des transcrits possèdent des rôles au niveau neuronal et particulièrement au niveau de la plasticité synaptique (Grange, Belly et al. 2009).

En terminant, il semble que Sam68 joue un rôle dans la traduction des ARNm auxquels elle est associée. En effet, suite à la dépolarisation neuronale, Sam68, de même que l'un des ARNm les plus fortement enrichi avec celle-ci, *eEF1A*, se retrouvent relocalisés à la fraction polysomale d'un gradient de sucrose. Cette hypothèse est également appuyée par le fait que l'expression d'un dominant négatif de Sam68, Sam68 Δ C, pouvant lier l'ARN mais ayant perdu certains domaines de liaison protéine-protéine, réduit les niveaux protéiques de *eEF1A*. De plus, il est suggéré que l'activation de Sam68 pourrait se

faire via l'activation des récepteurs NMDA, car ceux-ci sont retrouvés dans l'immunoprécipitat de Sam68 (Grange, Belly et al. 2009).

1.3.2.3. FMRP

La maladie du X fragile, caractérisée par un retard de développement mental, résulte de l'absence de l'expression de la protéine FMRP. Il s'agit d'une protéine associée à de nombreux ARNm neuronaux dont elle régule à la fois le transport et la traduction.

Afin d'identifier les ARNm associés à cette protéine, l'immunoprécipitation de celle-ci à partir d'un lysat de cerveau de souris fut effectuée (IP-wt), suivie de l'hybridation des ARNm isolés sur une micropuce d'ADN. L'ARNm isolé à partir de cerveaux de souris KO pour FMRP (IP-KO) fut utilisé comme contrôle négatif. De plus, afin de comparer la population d'ARNm liés par FMRP à la population cellulaire totale, une hybridation de 20% du lysat avant IP fut effectuée (Brown, Jin et al. 2001). Les gènes exprimés dans le cerveau de souris représentent environ 44% (11,067) des gènes présents sur la puce d'Affimetrix MG-U74 (25,181) utilisée (Brown, Jin et al. 2001).

Ainsi, 26% des ARNm présents furent enrichis d'au moins quatre fois dans l'IP-wt vs l'IP-KO. Cependant, plusieurs de ceux-ci font partie des ARNm les plus abondants. En effet, seulement 5% des 44% de transcrits sont enrichis de plus de quatre fois comparativement à la proportion présente dans l'ARNm total. Donc, afin de limiter les faux positifs, ils combinèrent ces deux résultats et réduisirent le nombre d'ARNm potentiellement lié à FMRP à 432, soit 3,9% des gènes exprimés (Brown, Jin et al. 2001). Ils confirmèrent leurs résultats par RT-PCR avec l'ajout d'ARNt et d'héparine afin de tester la spécificité de la liaison.

Afin d'étudier le rôle de FMRP sur l'état traductionnel des ARNm auxquels elle semble être associée, ils comparèrent les ARNm présents dans la fraction polysomale d'un gradient de sucrose entre une lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine wt et KO. Ainsi,

ils durent utiliser une micropuce d'ADN humaine, Affymetrix Hu35K, contenant 35000 gènes dont 11 000 furent exprimés dans cette lignée cellulaire. Au total, seulement 2% (environ) des 11 000 gènes eurent un profil polysomal modifié. De ceux-ci, 251 gènes furent exprimés à des niveaux semblables entre les deux lignées. Enfin, 136 transcrits furent enrichis dans la fraction polysomale de la lignée KO alors que 115 en furent diminués (Brown, Jin et al. 2001). FMRP semble donc jouer un rôle dans l'association ou non aux polysomes de nombreux ARNm.

Afin de faire la correspondance entre les gènes identifiés sur les puces humaine et murine, ils utilisèrent la base de données HomoloGene et comparèrent le numéro UniGene des gènes afin de trouver les orthologues correspondants.

Sur les 80 gènes les plus enrichis des 432 gènes identifiés dans l'IP-wt, la micropuce Human 35K comprenait l'orthologue humain correspondant de 48 gènes. De ce nombre, 28 furent exprimés dans la lignée lymphoblastoïde, dont 50%, soit 14 gènes, eurent un profil polysomal modifié, 6 furent enrichis et 8 diminués. Que l'association directe entre 50% des gènes liés par FMRP et leur distribution aux polysomes soit démontrée semble très prometteur dans la compréhension du rôle de FMRP au niveau de la traduction d'ARNm dendritiques.

Il est intéressant de constater que, sur une probabilité aléatoire de 4% qu'un gène possède une structure de G quartet 57% (8/14), des gènes présents à la fois dans l'IP-FMRP et dont le profil polysomal est modifié possèdent une telle structure. Il est donc fort probable que FMRP régule la traduction des ARNm via ce motif (Brown, Jin et al. 2001).

1.3.2.4. YB1

Le rôle de YB1 est principalement celui du maintien de la répression traductionnelle des ARNm qui lui sont associés. Elle peut à la fois inhiber la traduction dépendante de la coiffe et celle dépendante d'un IRES. Elle agit en liant la coiffe située en 5' de l'ARNm et

ainsi prévient l'arrivée des facteurs d'initiation de la traduction. En plus d'identifier une population d'ARNm liés par YB1, cette étude a permis de révéler que la phosphorylation de YB1, à la sérine 102, par la kinase Akt, relevait spécifiquement l'inhibition traductionnelle dépendante de la coiffe, et ce, en diminuant l'affinité de liaison de YB1 pour celle-ci (Evdokimova, Ruzanov et al. 2006).

Afin d'identifier les ARNm régulés par YB1, une étude de RIP-Chip fut entreprise à l'aide d'une puce MOE-430A représentant 22 626 gènes de souris. Les ARNm furent isolés à partir de cellules NIH 3T3 exprimant YB1-HA ou HA-seule. L'hybridation avec l'ARNm total identifia l'expression cellulaire de 40% des gènes présents sur la puce. Une population d'ARNm liés par YB1, 18% des ARNm totaux, fut mise à jour en soustrayant les ARNm isolés non-spécifiquement lors de l'IP-HA des transcrits isolés dans l'IP YB1. Plusieurs de ces ARNm n'avaient pas été identifiés lors de l'hybridation avec l'ARNm total, ce qui suggère un enrichissement considérable de ces ARNm dans les mRNP de YB1.

Les ARNm identifiés sont impliqués dans de nombreux aspects de la régulation cellulaire, dont le tiers semble jouer un rôle dans la croissance et le métabolisme cellulaire. La majorité des transcrits identifiés furent retrouvés dans les mêmes proportions que celles calculées au niveau cellulaire. Cependant, la population de gènes liés par YB1 est enrichie en ARNm responsables de la transduction du signal lorsque l'on compare avec les proportions cellulaires totales. Il est également intéressant de constater que plusieurs transcrits font partie d'une même voie métabolique, ce qui suggère que YB1 permettrait de coordonner leur expression lorsque nécessaire (Evdokimova, Ruzanov et al. 2006).

Les auteurs confirmèrent l'association de certains de ces ARNm dont *GADD45β*, *cyclin D1*, *c-jun*, *merck*, *PDGFR-β*, *TGFβi4*, et *VEGF-C* par RT-PCR et utilisèrent l'ARN ribosomique *L32* comme contrôle négatif. De plus, ils étudièrent l'effet de l'activation de la kinase Akt sur la liaison de YB1 à ses transcrits. Ces modifications de l'état d'Akt eurent un réel impact sur les ARNm associés par YB1. En effet, les ARNm de *merck*, *cyclin D1* et *PDGFR-β* furent grandement enrichis dans l'IP YB1 suite à l'inhibition d'Akt par la

wortmannin alors que la stimulation d'Akt par l'IGF-I diminue l'association de plusieurs de ces ARN (Evdokimova, Ruzanov et al. 2006).

Finalement, en accord avec ces résultats, ils ont pu observer à l'aide de la méthionine [³⁵S], un marqueur des protéines nouvellement synthétisées, que la faible traduction des ARNm liés par YB1 pouvait être augmentée suite à l'activation d'Akt par l'IGF1.

1.3.2.5. U2AF⁶⁵

Cette étude est très intéressante car elle met en parallèle deux populations d'ARNm retrouvées au sein de deux complexes ribonucléoprotéiques distincts, soit celui de la protéine U2AF⁶⁵ et celui de la protéine PTB, deux facteurs d'épissage associés au « spliceosome ». U2AF⁶⁵ possède trois domaines de reconnaissance de l'ARN (RRM) lui permettant de se lier à une séquence riche en polypyrimidines située en amont de l'extrémité 3' du site d'épissage. De plus, celle-ci a la capacité d'être exportée du noyau. Il n'a pas encore été déterminé si cet export se faisait en association avec un ARNm mature ou non. Les auteurs ont donc voulu aborder cette énigme, car si tel était le cas, il serait alors possible qu'U2AF⁶⁵ joue d'autres rôles au sein de la cellule que celui de facteur d'épissage (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006). PTB est une protéine possédant quatre motifs RRM liant également les extensions riches en polypyrimidines. Elle joue un rôle dans de nombreux aspects de la régulation d'ARN, tels l'épissage, la polyadénylation, la formation de l'extrémité 3', la traduction IRES dépendante, la localisation et la stabilité de l'ARN (Auweter and Allain 2008).

La technique de RIP-Chip fut utilisée afin de démontrer la liaison d'U2AF⁶⁵ avec une population d'ARNm épissés. De plus, les auteurs comparèrent les ARNm identifiés avec ceux associés à la protéine PTB, qui, en plus d'être un facteur d'épissage, est impliquée dans le transport, la stabilité et la traduction d'ARNm.

Les hybridations furent effectuées sur les puces d’Affymetrix 133U Plus 2.0, contenant 54 000 gènes du génome humain, avec les ARNm isolés de trois expériences indépendantes d’IP- U2AF⁶⁵ et de deux IP-PTB. Ils utilisèrent comme contrôle l’ARNm isolé uniquement à l’aide des billes de sépharose. Aucun ADNc ne pu être reverse-transcrit à partir de ces contrôles. Encore une fois, quelques puces furent réseées pour l’hybridation de l’ARNm cellulaire total (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006). Ils utilisèrent comme outil d’analyse le programme dChip.

Dans un premier temps, les ARNm enrichis d’au moins 100 fois dans les IP par rapport à la proportion retrouvée dans la population totale d’ARNm furent retenus. Ainsi, ils espérèrent exclure un nombre maximal de faux positif, malgré la perte potentielle de réels transcrits. U2AF⁶⁵ et PTB sont chacune associée à environ 20% des gènes exprimés. Comme prévu, la population d’ARNm mise en relief diffère entre les protéines U2AF⁶⁵ et PTB, chacune étant associée à 10% des transcrits exprimés. Cependant, un autre 10% des transcrits exprimés se retrouve communément présents dans les mRNP de ces deux protéines (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006).

Ils confirmèrent leurs résultats en effectuant l’immunoprécipitation de ces protéines, suivie de la reverse-transcription en temps réel des ARNm isolés. Pour ce faire, ils choisirent huit ARNm enrichis dans l’IP-U2AF⁶⁵ et huit dans l’IP-PTB de même que trois ARNm non enrichis dans ces deux IP (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006).

Ensuite, à l’aide des programmes d’annotation DAVID et d-Chip, les auteurs ont pu établir que les rôles principaux des ARNm associés à la protéine U2AF⁶⁵ étaient la transcription et la régulation du cycle cellulaire alors que ceux associés à la protéine PTB étaient principalement le transport intracellulaire et vésiculaire. De plus, les ARNm communs aux deux protéines sont reliés principalement au phénomène d’ubiquitination et de signalisation par les petites GTPases (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006).

Pour chacune de ces deux protéines, une séquence nucléotidique consensus avait déjà été identifiée au cours d'études antérieures. Ils ont ainsi cherché à vérifier si ces séquences se retrouvaient bel et bien en plus grande proportion au sein des ARNm identifiés avec U2AF⁶⁵ et PTB, comparativement à un groupe contrôle d'ARNm sous représentés dans ces mRNP. Comme de fait, la séquence consensus était enrichie de 1,4 fois et de 1,5 fois dans les ARNm associés à U2AF⁶⁵ et PTB, respectivement. De plus, cet enrichissement est principalement localisé dans la région 3'UTR de l'ARNm (Gama-Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006).

1.3.2.6. IMP1

Enfin, les ARNm isolés du complexe d'IMP1-FLAG furent identifiés à l'aide de la puce d'Affymetrix humaine 133 Plus 2.0, dont 43% des gènes sont exprimés dans les cellules HEK293. L'ARNm isolé à partir des cellules exprimant uniquement FLAG fut utilisé comme contrôle négatif. Les auteurs firent leur sélection selon que les ARNm étaient enrichis d'au moins 100 fois par rapport à l'IP contrôle et 3 fois par rapport à la population d'ARNm cellulaire total. Ainsi, ils identifièrent 322 transcrits pour un total d'environ 3% des gènes exprimés au sein des cellules HEK293 (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Il fut intéressant d'observer que les ARNm représentés en faible quantité dans la cellule étaient les plus enrichis dans l'IP IMP1-FLAG et que les 100 ARNm les plus abondants n'y furent point retrouvés (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Les auteurs effectuèrent un contrôle des plus intéressants. Sachant qu'il existe une possibilité que certains transcrits se dissocient et d'autres se réassocient au complexe ribonucléoprotéique lors de la précipitation, ils voulurent en identifier la portée. Ainsi, ils ajoutèrent au lysat un extrait cellulaire de cellules S2 de drosophile. Les ARNm isolés du complexe IMP1-FLAG furent ensuite hybridés sur la puce de *Drosophila* Genome 2.0. Malgré qu'ils diminuèrent leurs critères de sélection afin d'y inclure les transcrits enrichis

d'au moins 50 fois dans l'isolat, ils n'identifièrent aucun ARNm de drosophile au sein de ce complexe. Il est donc peu probable que des transcrits autres que ceux présents dans le complexe d'IMP1 se soient associés non-spécifiquement lors de la précipitation (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

La proportion de ces transcrits directement liés par IMP1 fut ensuite abordée. Pour ce faire, ils utilisèrent les rayons UV afin de réticuler 8 des ARNm identifiés et 10 contrôles négatifs. Seuls les 8 ARNm positifs à l'hybridation des puces eurent la capacité d'être réticulés avec IMP1 (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

À l'aide du programme d'annotation Gene Ontology, on identifia la fonction des ARNm identifiés. Les ARNm furent sensiblement associés à toutes les catégories présentes au sein de la cellule. Les mêmes proportions, par rapport aux concentrations d'ARNm total, furent observées pour les transcrits associés aux facteurs nucléaires, mitochondriaux, cytosoliques, du peroxisome ou encore de la matrice extracellulaire. Cependant, les mRNP d'IMP1 semblent enrichis, par rapport aux proportions d'ARNm totales, en transcrits responsables de la sécrétion et du métabolisme protéique, de même que de la voie d'ubiquitination. Au contraire, les ARNm encodant les protéines responsables du métabolisme de l'ARN et de la traduction furent sous représentés (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

2. Transport et traduction d'ARNm neuronaux

Cette thèse s'intéresse principalement aux complexes de transport dendritique de l'ARNm. Un phénomène que nous aborderons en détail dans cette section.

2.1. Les nombreuses implications de la traduction locale d'ARNm

Le transport et la traduction locale d'ARNm sont des mécanismes responsables de nombreux phénomènes cellulaires tels l'axe de développement de l'ovocyte (*oskar*, *bicoid*, *gurken*, *nanos*, *Vg1*), l'identité cellulaire de la cellule fille chez la levure (*ASH1*), la direction de migration du fibroblaste (*actine-β*, les ARNm du complexe *Arp2/3*), la myélinisation des axones par l'oligodendrocyte (*MBP*), le déplacement du cône de croissance axonal (*actine-β*) ou encore la plasticité synaptique (*CamKIIα*, *Arc*). Nous avons longtemps cru qu'il s'agissait d'un mécanisme pointu de régulation génique s'appliquant à une fraction des ARNm transcrits. Cependant, de plus en plus d'études tendent à suggérer qu'il s'agirait, au contraire, d'un phénomène beaucoup plus généralisé (Meignin and Davis 2010). À titre d'exemple, une équipe de Toronto a su démontrer, par hybridation *in situ* chez la drosophile, la localisation de 71% des transcrits étudiés (Lecuyer, Yoshida et al. 2007).

L'expression localisée d'ARNm est possible via le transport d'ARNm, mais il ne faut pas oublier qu'il existe également d'autres mécanismes. Par exemple, l'activation nucléaire spécifique d'une sous-classe de noyau, présent au sein d'un syncytium, comme c'est le cas dans la fibre musculaire et dans l'ovocyte. Ou encore, il est possible de permettre la diffusion d'un transcrit, puis d'en induire la dégradation de façon généralisée, à l'exception de l'endroit où son expression est requise. C'est ainsi que l'ARNm *nanos* est ciblé pour la dégradation par la protéine Smaug. En effet, Smaug recrute le complexe de

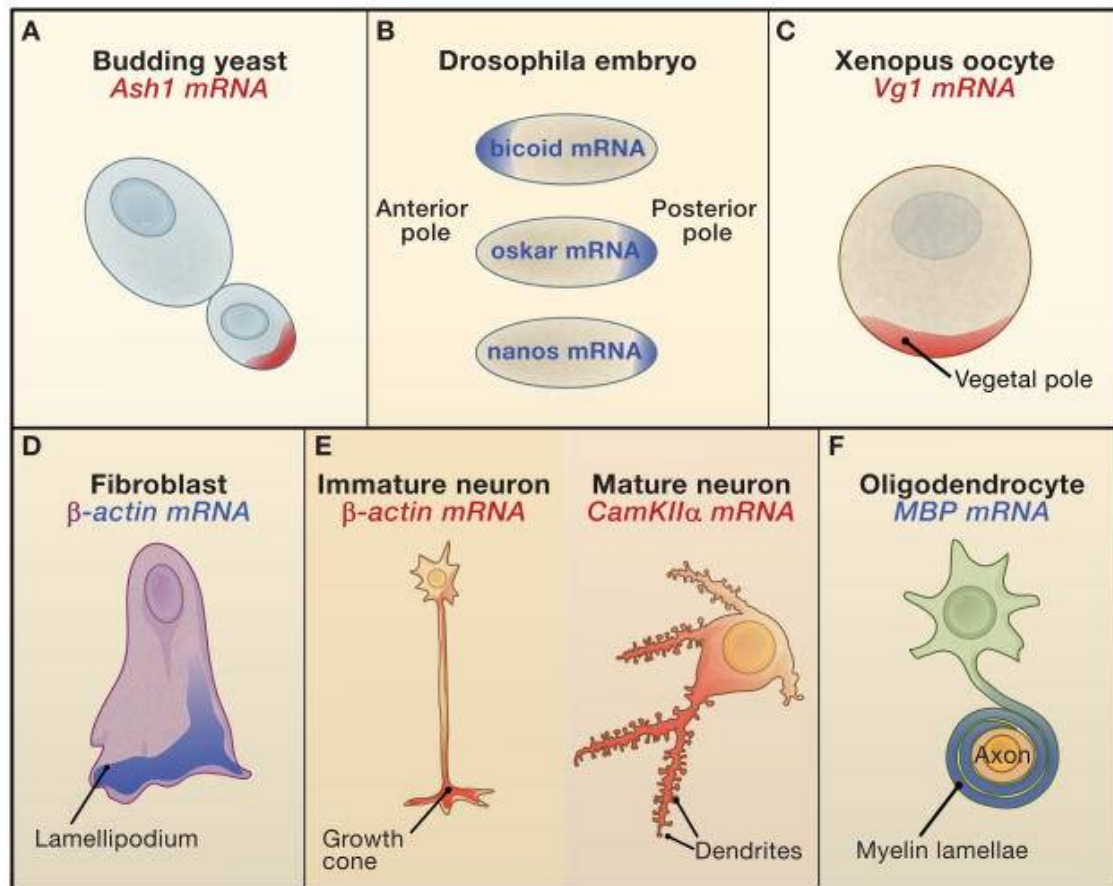


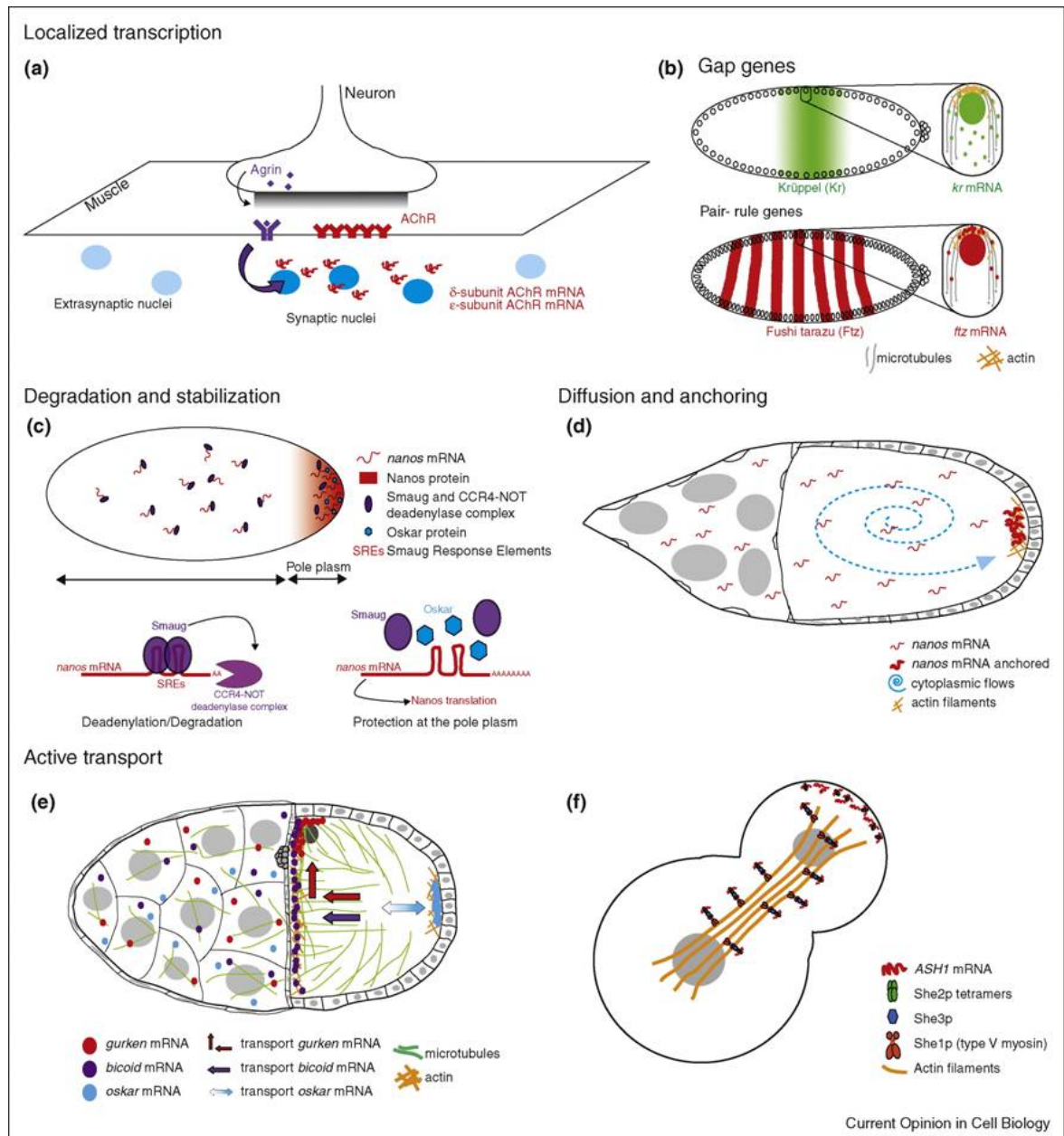
FIGURE 5 : Exemple classique d'ARNm localisés

A) Chez la levure, le transcrite d'*ASH1* est localisé au pôle de la cellule fille. **B)** Dans l'embryon de drosophile, le transcrite de *bicoid* est localisé au pôle antérieur, alors que ceux d'*oskar* et de *nanos* sont localisés au pôle postérieur. **C)** Au stade IV du développement de l'ovocyte de xénope, l'ARNm de *Vg1* est localisé au pôle végétal de celui-ci. **D)** le transcrite de l'*actine-β* est localisé dans les lamellipodes des fibroblastes **E)** Dans les neurones immatures en développement, l'ARNm de l'*actine-β* est présent au pôle distal du cône de croissance. Dans les neurones matures, le transcrite de la *CamKIIα* est transporté au niveau des dendrites distales. **F)** Dans les oligodendrocytes, le transcrite de la *MBP*, protéine basique liant la myéline, est localisé dans les prolongements membranaires de myéline. (Martin and Ephrussi 2009)

FIGURE 6 : Survol des différents mécanismes de localisation d'ARN

(a,b) **Transcription localisée.** (a) Transcription localisée du transcrite de l'*AChR*, récepteur de l'acétylcholine, dans les noyaux situés au niveau de la synapse activée de la jonction neuromusculaire. (b) Transcription locale suivie du transport actif, au sein du blastoderme syncytial de l'embryon de drosophile, des gènes de types Gap et Pair-rule. (c) **Dégradation et stabilisation.** Dans l'embryon de drosophile, la protéine Smaug lie les éléments de régulation SREs (Smaug Response Element) de l'ARNm et recrute alors le complexe de déadénylation, CCR4-Not, afin de permettre la dégradation des transcrits non localisés de *nanos*. Cependant, au pôle postérieur de l'ovocyte, la protéine Oskar inhibe le recrutement de Smaug sur l'ARNm de *nanos* et permet ainsi sa traduction. (d) **Diffusion et ancrage.** Lors de l'ovogénèse tardive chez la drosophile, la contraction des cellules nourricières crée une vague cytoplasmique facilitant la diffusion du transcrite de *nanos*. Une fois arrivé au pôle postérieur, celui-ci est ancré aux microfilaments d'actine. (e,f) **Transport actif.** (e) À la mi-ovogénèse, dans l'ovocyte de drosophile, la localisation des transcrits de *gurken*, *bicoid* et *oskar* est dépendante du réseau de microtubules. Le transport de l'ARNm de *gurken* s'effectue en deux temps et dépend du moteur moléculaire, la dynéine. Également dépendante de la dynéine, la localisation du transcrite de *bicoid* s'effectue cependant en une étape. Finalement, la localisation du transcrite d'*oskar* nécessite plutôt la participation de la kinésine et arbore un mouvement davantage aléatoire avec un biais pour le pôle postérieur. (f) Chez la levure, le transcrite d'*ASH1* est transporté jusqu'à la cellule fille le long des filaments d'actine par la myosine. (Adapté de (Meignin and Davis 2010))

FIGURE 6



déstabilisation CCR4/POP2/NOT, sauf au pôle postérieur où il interagit plutôt avec la protéine oskar afin de permettre au transcrit nanos d'être traduit (Zaessinger, Busseau et al. 2006). Il est également possible que la traduction locale d'un transcrit diffus soit permise par son ancrage à l'endroit requis.

Cependant, au niveau neuronal, le principal mécanisme est la localisation active d'ARNm. Dans la majorité des cas, le transcrit possède dans sa région 3'UTR une séquence de localisation reconnue par une protéine agissant en *trans* et permettant le transport de l'ARNm à l'endroit désigné. La régulation intracellulaire du neurone s'avère très complexe, de par son large volume, sa forme irrégulière et ses nombreux contacts synaptiques (Bramham and Wells 2007). La traduction locale d'ARNm permet ainsi une régulation fine soit de l'axone, de chacun des prolongements dendritiques ou de l'une des nombreuses épines synaptiques, et ce, indépendamment les uns des autres. Cette traduction de nouveaux transcrits induit la modulation de diverses structures telles la croissance axonale, la croissance dendritique, ou encore la mise en place des phénomènes de la LTP ou la LTD, deux phénomènes synaptiques que nous aborderons à l'instant puisque nous y ferons référence par la suite.

2.2. Fonction de la traduction localisée sur la modulation synaptique :

LTP et LTD

Quelle est l'importance d'une telle localisation dendritique d'ARNm? Au niveau cellulaire, il existe deux mécanismes de modulation synaptique, soit la LTP (potentialisation à long terme) et la LTD (dépression à long terme). Il s'agit d'un changement à long terme se produisant entre l'élément pré et post-synaptique qui modifie leur force d'association. Dans la LTP, l'association est renforcée et la transmission synaptique s'en trouve facilitée, alors que dans la LTD, celle-ci est affaiblie et la transmission synaptique s'en trouve diminuée.

La modification d'une synapse, qu'elle soit renforcée comme dans la LTP ou diminuée comme dans la LTD, découle d'un remodelage synaptique qui dépend de la synthèse protéique. Cette synthèse est régulée à la fois dans le temps et dans l'espace. En effet, on ne peut contrer l'induction de la LTP ou de la LTD, avec un inhibiteur de traduction, que pendant un certain laps de temps. De même, afin de médier son effet, la nouvelle protéine se doit d'être localisée dans le bon compartiment neuronal.

Il est possible d'induire la LTP et la LTD via des protocoles de stimulation de haute fréquence et de basse fréquence respectivement. Afin d'être consolidés, ces phénomènes traversent un stade de modification précoce puis tardif. Ce dernier dépend de la synthèse de nouvelles protéines. C'est alors que l'on peut parler de consolidation.

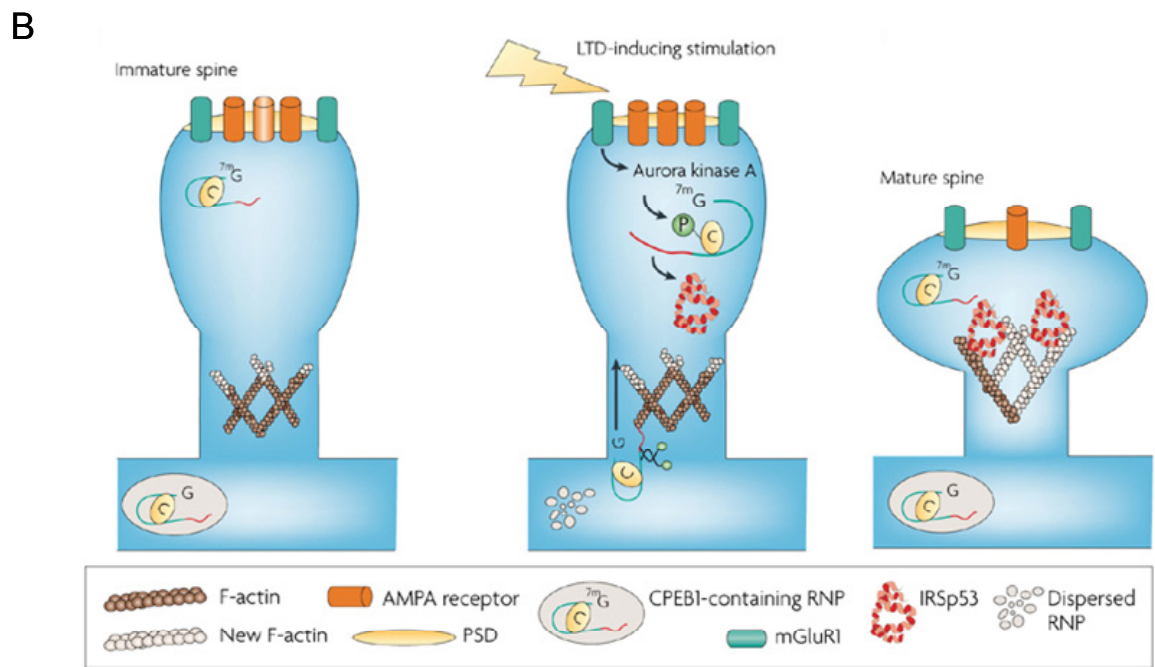
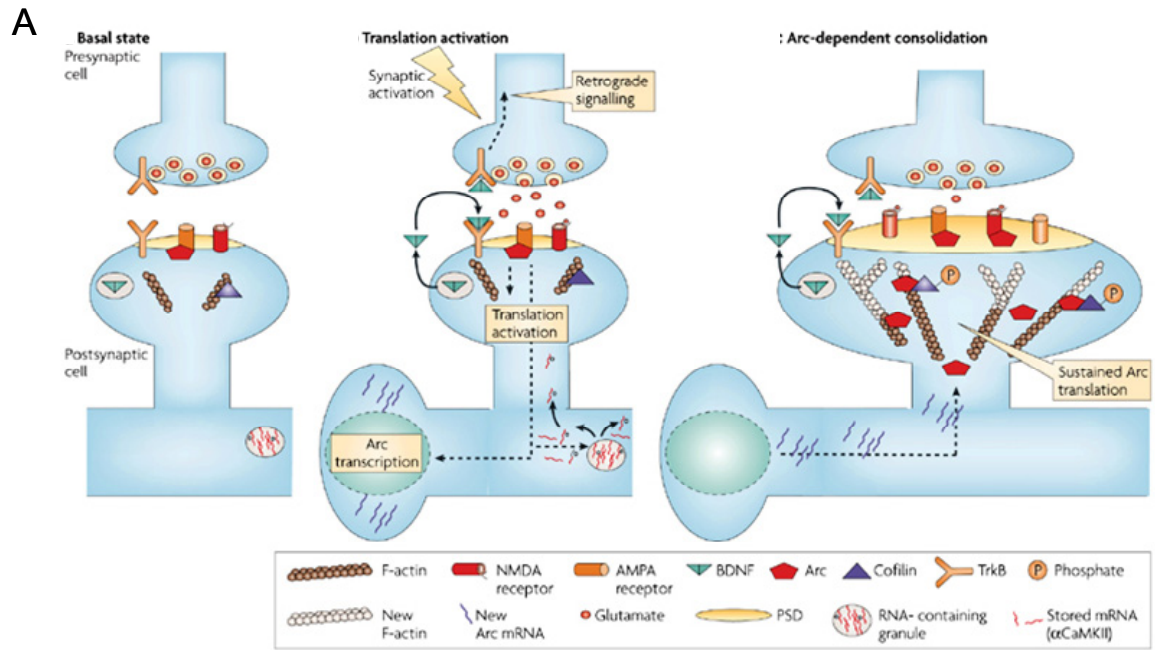
Afin de mettre en place ces deux phénomènes, de nombreux acteurs entrent en ligne de compte. Il y a des changements au niveau des récepteurs présents à la surface de la synapse, des modifications dans les protéines signalisatrices et dans la structure même de l'épine. Le transport et la traduction locale sont à la base de cette restructuration responsable du développement neuronale et de l'apprentissage (Bramham and Wells 2007).

FIGURE 7 : Exemples de modèles synaptiques de LTP et de LTD

A) L'activité synaptique, représentée ici par la stimulation à haute fréquence, induit la transcription et la traduction de nouveaux transcrits, dont *Arc*, ainsi que la traduction d'ARNm demeurés sous forme silencieuse au sein de complexes ribonucléoprotéiques, tel *CaMKIIa*. Les protéines nouvellement synthétisées permettent de moduler la structure de l'épine, via le remodelage des filaments d'actine, afin de consolider la transmission synaptique. Un mécanisme appelé L-LTP. B) À l'inverse, le protocole d'induction de la LTD permet l'expression d'une autre classe de transcrits, dont *IRSp53*, et, toujours via la restructuration du réseau d'actines, permet cette fois de réduire la force de l'association synaptique. Un mécanisme appelé LTD.

(Bramham and Wells 2007)

FIGURE 12



2.2.1. Mise en place de la LTP

Le remodelage synaptique permettant la mise en place de la LTP repose principalement sur l'expansion de la structure du cytosquelette d'actine au sein de l'épine, ce qui induit un changement morphologique modifiant la tête, préalablement petite, en une tête plus large en forme de champignon (Fukazawa, Saitoh et al. 2003). La polymérisation de l'actine permettra à la densité post-synaptique (PSD) de s'accroître et par le fait même à un nombre accru de récepteurs de s'ancrer à la membrane. Le tout est permis grâce à la traduction d'ARNm au niveau synaptique. Ainsi, plusieurs acteurs entrent en ligne de compte, dont Arc, egr1, tPA, Limk1 et la cofilin (Bramham and Wells 2007).

La LTP induit la phosphorylation de la cofilin, ce qui inhibe son activité déstabilisatrice et permet alors la polymérisation des filaments d'actine. Le rôle du réseau d'actines est tellement important que l'injection d'ARN anti-sens contre le transcrit de *Arc*, qui normalement aurait inhibé la mise en place de la LTP, est contré par une drogue qui stabilise les filaments d'actine (Bramham and Wells 2007). La kinase PKMc, de son côté, permet le maintien de la LTP en participant à l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la surface synaptique (Ling, Benardo et al. 2006).

La LTP est en fait composée de deux étapes, la E-LTP et la L-LTP. La E-LTP est une forme de modification synaptique à court terme. Celle-ci repose sur la modification post-traductionnelle des protéines synaptiques déjà présentes dans l'épine et n'est pas dépendante de la transcription ou de la traduction de nouveaux ARNm. Au contraire, la L-LTP est une modification à long terme nécessitant l'apport de ces deux mécanismes. L'apprentissage et la mémoire découlent de modifications permanentes, c'est pourquoi lorsque l'on parle de LTP on fait référence à la L-LTP.

L'induction de la E-LTP, représentée par l'EPSP précoce (voir la section 2.3.6.1), est abolie par l'ajout d'un inhibiteur des récepteurs AMPA, le CNQX, mais non par la

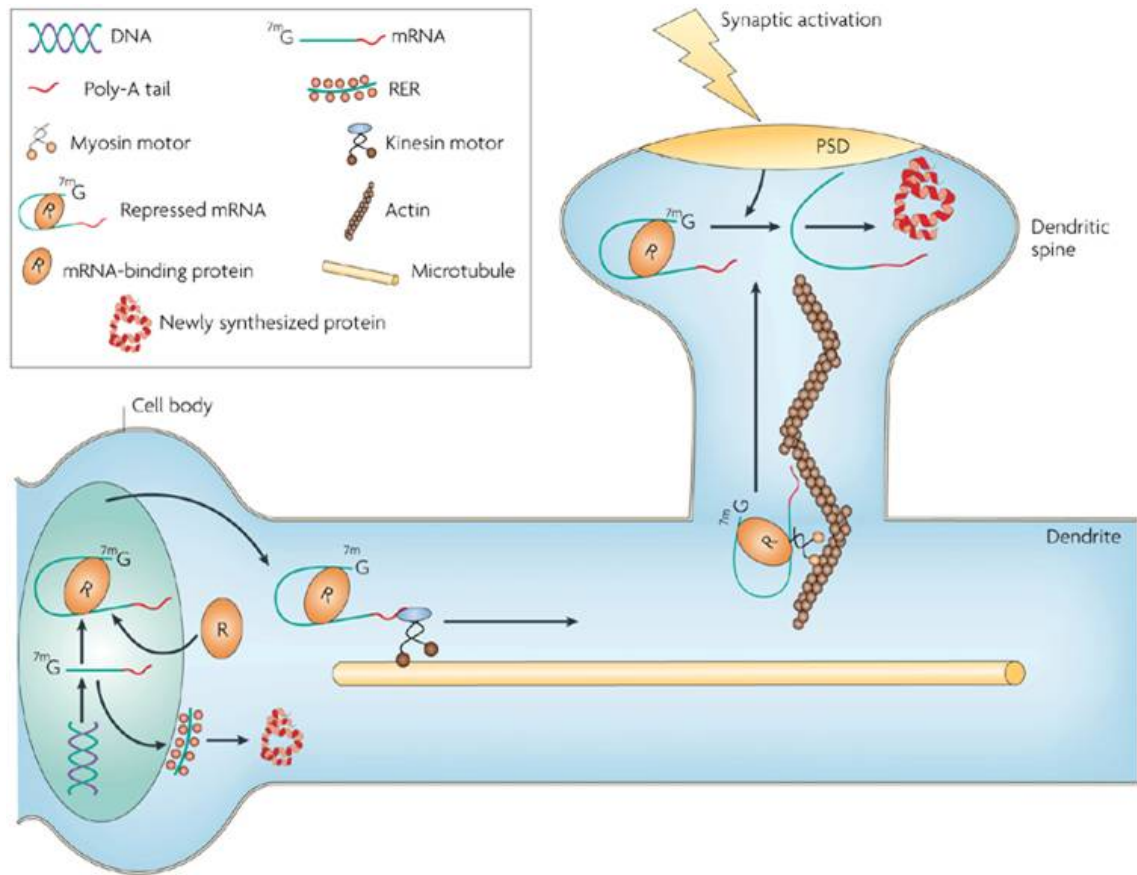
présence de l'inhibiteur des récepteurs NMDA, l'APV. Ce qui est en accord avec l'absence d'un rôle au niveau des récepteurs NMDA dans la E-LTP. L'inhibiteur des récepteurs AMPA, de même que celui des récepteurs NMDA, bloque cependant la mise en place de la L-LTP. En effet, la dépolarisation massive permettant de lever l'inhibition des récepteurs NMDA, par l'ions Mg^{+} , nécessite l'activation des récepteurs AMPA (Steward and Worley 2001).

2.2.2. Mise en place de la LTD

La LTD est également dépendante de la synthèse protéique (McCoy and McMahon 2007). Nous avons déjà discuté de l'importance de FMRP dans ce processus. Il semble que CPEB1 y soit également impliquée. Un mutant de CPEB1 ne pouvant être phosphorylé, et donc, ne pouvant lever l'inhibition de la traduction des transcrits qui lui sont associés, n'a plus la capacité d'induire la LTD dans un modèle cérébelleux. Ce qui est en contraste avec la sous-expression de FMRP, qui elle induit une accentuation de la LTD. Dans les deux cas, il y a allongement des épines synaptiques (Bramham and Wells 2007).

Cependant, notons que la LTD n'est pas toujours dépendante de la traduction de nouvelles protéines. En effet, l'induction de la LTD, via l'activation des récepteurs mGluR1/5 au niveau des cellules pyramidales, est dépendante de la traduction dans les neurones matures, mais est indépendante de la traduction dans les neurones encore en développement (Fitzjohn, Kingston et al. 1999).

Nous nous attarderons dans cette prochaine section à décrire les différentes étapes du transport dendritique d'ARNm ainsi que les divers mécanismes qui les régulent. Néanmoins, nous n'hésiterons pas à inclure certains phénomènes ayant été mieux décrits dans d'autres systèmes cellulaires.



Nature Reviews | Neuroscience

FIGURE 8 : Modèle de localisation d'ARNm dans un neurone de mammifère

Dans le noyau, les transcrits naissant s'associent à des facteurs spécifiques agissant en *trans* responsables de leur localisation. Ces ARNm sont ensuite exportés du noyau et assemblés à d'autres facteurs afin de former des mRNP de transport. À l'aide de moteurs moléculaires, tels la kinésine ou la dynéine, ces complexes sont transportés sur le réseau de microtubules le long des dendrites jusqu'à leur destination finale. Ces mRNP sont ensuite ancrés au niveau de l'épine synaptique sous forme de complexes silencieux. Lorsque la synapse est stimulée, il y a levée de l'inhibition de la traduction et synthèse locale de nouveaux produits protéiques. Ce mécanisme permet de moduler la transmission synaptique spécifiquement à la synapse activée. (Bramham and Wells 2007)

2.3. Principales étapes de la localisation dendritique d'ARNm

2.3.1. Initiation nucléaire du transport d'ARNm

Divers résultats tendent à démontrer que l'ARNm est d'abord reconnu dans le noyau de la cellule avant d'être localisé à l'endroit désigné. Par exemple, il y a la présence au sein des complexes de transport de nombreuses protéines majoritairement nucléaires telles les hnRNPs et les protéines du complexe de jonction exon-exon qui sont déposées sur l'ARNm lors de son épissage. Au niveau dendritique, le transcrit de Arc est associé au facteur d'initiation et d'épissage eIF4AIII, facteur déplacé lors de la ronde pionnière de traduction (Giorgi, Yeo et al. 2007).

De plus, l'importance de ces facteurs dans la localisation de certains transcrits fut démontrée. En effet, les facteurs du complexe de jonction exon-exon, Y14/Tsunagi et Mago, sont nécessaires à la localisation du transcrit d'*oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte chez la drosophile (Hachet and Ephrussi 2004).

Ces observations suggèrent que le complexe de transport soit formé à la suite ou même au moment de la transcription de l'ARNm et qu'il soit ensuite exporté du noyau où il est localisé à l'endroit approprié (Bramham and Wells 2007). Un exemple très concret d'un tel modèle est celui de la visualisation de la protéine ZBP1 au site de transcription de l'ARNm de l'*actine-β*, transcrit auquel elle s'associe afin d'en initier le transport dendritique (Oleynikov and Singer 2003).

2.3.2. L'export nucléaire

Il existe quatre grandes étapes de maturation auxquels doit faire face le nouveau transcrit avant d'être exporté ; l'ajout de la coiffe en 5', l'épissage, le clivage de l'extrémité 3' et l'ajout de la queue poly(A). Chaque étape permet de recruter des facteurs nécessaires à l'export et à la localisation du transcrit. Lorsqu'il y a erreur dans l'un ou l'autre de ces

processus, le transcrit est alors dirigé vers l'exosome où il sera dégradé (Carmody and Wentz 2009).

L'import et l'export nucléocytoplasmique de la majorité des protéines sont médiés par une famille de protéines appelées les karyophérine- β . Celles reconnaissant la séquence de localisation nucléaire (NLS) d'une protéine afin d'en induire l'import au noyau, sont appelées les importines. Celles reconnaissant la séquence d'export nucléaire (NES) permettant l'export d'une protéine, sont appelées les exportines (Sorokin, Kim et al. 2007).

La majorité des karyophérines- β reconnaissent directement leur substrat. Néanmoins, certaines d'entre elles nécessitent la participation d'une protéine adaptatrice. Les adaptateurs sont appelés karyophérines- α ou encore importines- α . Il s'agit souvent de facteurs impliqués dans les diverses voies de régulation de l'ARNm mentionnées plus haut (Sorokin, Kim et al. 2007).

Cependant, la majorité des ARNm ne sont pas exportés par la voie des karyophérines, mais le sont plutôt via l'hétérodimère TAP/p15, aussi connu sous l'appellation Nxf1/Nxt1 (Sorokin, Kim et al. 2007)(Carmody and Wentz 2009).

Suite à l'ajout de la coiffe et à l'épissage de l'ARNm, il y a recrutement au niveau du transcrit d'un complexe transcription-export, TREX, formé entre autres des protéines UAP56 et ALY (Carmody and Wentz 2009). TAP/p15 est alors recruté par ALY et achemine le mRNP vers le pore nucléaire. Il existe cependant certains ARNm qui sont bel et bien exportés via Crm1, une karyophérine (Carmody and Wentz 2009).

Le complexe d'export dirige ensuite le mRNP vers le pore nucléaire, un complexe de plus de 30 protéines. Ainsi, les exportines et/ou les adaptateurs se lient aux protéines FG-Nups du pore nucléaire et le mRNP est ensuite transloqué au cytoplasme (Carmody and Wentz 2009).

Une fois au cytoplasme, certains facteurs s'ajoutent alors que d'autres se détachent du mRNP, et ce, de façon très rapide. En effet, il semble que l'ARNm soit exporté avec en tête son extrémité 5' et qu'il y ait alors immédiatement remplacement du CBC par eIF4E, et ce, avant même que l'export du transcrit soit terminé (Carmody and Wentz 2009).

La régulation de ces facteurs d'import et d'export permet de réguler finement divers processus cellulaires. Par exemple, l'expression spécifique de certaines karyophérines- β permet, en régulant le trafic nucléaire, de réguler la différenciation cellulaire neuronale versus gliale (Chaerkady, Kerr et al. 2009). De plus, il est connu que la L-LTP soit un mécanisme qui nécessite la transcription de nouveaux ARNm. Ainsi, il est important que le message capté en périphérie soit acheminé au noyau afin d'initier cette transcription. Il fut démontré que les importines étaient présentes au niveau synaptique et que les stimuli induisant la L-LTP induisaient également le transport rétrograde des importines α et β jusqu'au noyau, un transport en effet nécessaire à la mise en place de la L-LTP. Au contraire, ce transport n'est pas sollicité lors de la mise en œuvre de la E-LTP, un mécanisme indépendant de la transcription (Perry and Fainzilber 2009). Finalement, il est intéressant de constater que certains cargos de ces karyophérines- β sont des protéines indispensables à l'établissement de la L-LTP, telles que les facteurs de transcription CREB et NF- κ B (Ryan, Harries et al. 2006) (Torgerson, Colosia et al. 1998).

2.3.3. Les diverses voies de transport empruntées

2.3.3.1. Les microtubules

Les complexes d'ARNm se déplacent le long des dendrites et des axones sur des voies formées par les microtubules. Il s'agit de structures cylindriques formées à l'aide d'hétérodimères de tubuline- α et de tubuline- β . La polymérisation de ces dimères, forment des structures appelées protofilaments, ensuite l'association de celles-ci sous forme de cylindre, forment le microtubule. La polarité de ces associations crée sur cette structure

deux extrémités distinctes. En effet, les sous-unités alpha sont exposées à l'extrémité négative alors que la sous-unité bêta se retrouve à l'extrémité positive.

Ces structures polarisées permettent de donner un sens au transport dendritique et axonal. Au niveau des axones et des dendrites distales, les microtubules n'ont qu'une polarité, c'est-à-dire l'extrémité positive en direction de la synapse et l'extrémité négative vers le corps cellulaire. Cependant, dans les dendrites proximales la polarité des microtubules présentes est mixte (Hirokawa 2006). De plus, nous ne retrouvons aucun microtubule dans les épines dendritiques.

2.3.3.2. Les filaments d'actine

Dans les neurones, les filaments d'actine se retrouvent plutôt au niveau de l'épine. Cela suggère qu'une fois le granule arrivé à destination celui-ci soit transporté dans la tête de l'épine par ces filaments d'actine (Hirokawa 2006). Cependant, il existe également des réseaux de filament d'actine au niveau dendritique. En effet, c'est la voie empruntée par la protéine TLS (Hirokawa 2006).

Il semble que le réseau d'actine soit la principale voie empruntée dans les cellules de petites tailles telles la levure et le fibroblaste (Bassell and Singer 1997). Le transport de l'ARNm *ASH1* de la cellule mère à la cellule fille, chez la levure, est certainement l'un des ARNm, transporté cette voie, des plus étudiés (Bullock 2007). La protéine She2p reconnaît une structure tige boucle au niveau de l'ARNm de *ASH1*. She2p est ensuite liée par She3p qui fait le lien avec le moteur moléculaire responsable de la localisation du transcrit, une myosine de type V, Myo4p. She4p est également nécessaire à la localisation du transcrit en stimulant l'activité de la myosine (Wesche, Arnold et al. 2003).

Finalement, il est intéressant de constater que le transport du transcrit de l'*actine-β* chez le fibroblaste requiert uniquement le réseau de filaments d'actine, contrairement à la localisation du même transcrit au niveau neuronal qui lui requiert également l'intégrité du réseau de microtubules (Bullock 2007).

2.3.4. Les types de mouvements observés

Le transport des complexes en direction des extrémités du neurone est appelé transport antérograde. Lorsqu'un complexe revient vers le corps cellulaire, nous dirons qu'il adopte un transport rétrograde. Il arrive également que certains complexes bougent dans les deux directions. Si le mouvement est rapide et autour d'un point central, nous parlerons d'oscillation, alors que si le mouvement est plus ample, nous parlerons alors d'un mouvement bidirectionnel (Welte 2004).

2.3.5. Les moteurs moléculaires

Lors de la localisation d'ARNm, les mRNP se déplacent le long des différentes structures du cytosquelette à l'aide d'un moteur moléculaire spécifique. Celui-ci se déplace via la mise en place d'un cycle complexe d'hydrolyse d'ATP au niveau de la tête du moteur. C'est cette région du moteur qui est responsable de l'association au cytosquelette, alors que c'est la queue du moteur qui s'associe avec le cargo moléculaire (Karcher, Deacon et al. 2002). Cependant, le lien protéique entre le moteur et le mRNP est encore inconnu.

La dynéine et la kinésine sont deux moteurs moléculaires se déplaçant le long des microtubules. L'un vers le pôle négatif, la dynéine, et l'autre vers le pôle positif, la kinésine. À l'opposée, la myosine est un moteur qui emprunte plutôt les filaments d'actine (Bullock 2007). Plusieurs moteurs peuvent se retrouver au sein d'un même complexe et agir en synergie ou, au contraire, en opposition les uns avec les autres (Gross, Tuma et al. 2002). Ce sont les diverses voies de signalisation neuronale qui favorisent le mouvement du mRNP dans une direction plutôt qu'une autre et versus un mouvement oscillatoire ou encore bidirectionnel (Bramham and Wells 2007). Dans certaines situations, il existe même des échanges rapides entre les filaments d'actine et les microtubules.

2.3.6. Les signaux qui induisent la localisation

Il existe divers modèles biologiques de mémoire et d'apprentissage, que ce soit chez la drosophile, l'aplysie ou encore à l'aide de tranches ou de neurones d'hippocampes de rat en cultures. Ainsi, plusieurs signaux peuvent induire la localisation dendritique de divers ARNm. Dans cette section, nous discuterons brièvement de deux mécanismes d'activation généraux, soit l'activité électrique et la dépolarisation par le KCl. Il est possible par la suite de décortiquer ces voies d'activation afin de cibler quels sont les récepteurs impliqués, ou encore, quelles voies de signalisation doivent être activées afin d'induire la localisation d'un transcrit précis.

2.3.6.1. La stimulation dendritique électrique localisée

L'hippocampe est la région du cerveau qui synthétise les nouvelles informations perçues et qui permet ensuite de les emmagasiner sous forme de nouveaux souvenirs. Il est possible d'isoler cette structure et d'étudier les circuits synaptiques qui existent entre les différentes voies neuronales. Il s'agit d'un modèle cellulaire de mémoire et d'apprentissage grandement utilisé.

Nous pouvons induire la E-LTP et la L-LTP en activant les fibres pré-synaptiques selon divers protocoles de stimulation électrique ou chimique. Nous observons une augmentation du potentiel d'excitation post-synaptique (EPSP) 90 minutes après cette stimulation. Celle-ci est maintenue dans la L-LTP alors qu'elle revient au niveau de base dans la E-LTP.

Arc fut l'un des premiers ARNm dont la localisation fut étudiée chez les neurones. L'activation de la L-LTP via la stimulation de la voie perforante (pré-synaptique) induit la localisation de l'ARNm *Arc* dans les couches dendritiques profondes (post-synaptiques) du gyrus dentelé (Steward and Worley 2001).

Ce transport est effectué en deux étapes : la première est la transcription de nouveaux transcrits d'ARNm de *Arc* et la seconde est la localisation de ces transcrits. En effet, il fut possible d'induire l'expression du transcrit, par électroconvulsion (ECS), puis d'enrichir une région dendritique précise en stimulant spécifiquement cette région dendritique, avec 8 pulses de 400Hz au 1/10 de sec.

Ce résultat indique que la localisation ne dépend pas uniquement d'un transport diffus d'ARNm, mais qu'il existe bel et bien un mécanisme permettant la localisation du transcrit uniquement au niveau des synapses stimulées. En effet, sans cette seconde activation le transcrit aurait été localisé de façon diffuse. Afin que le transcrit soit localisé au niveau post-synaptique, les épines doivent donc avoir été préalablement activées. Ces observations sont à la base de l'étiquette synaptique qui cible les ARNm aux synapses activées (Steward and Worley 2001).

2.3.6.2.KCl

Il est possible d'activer les neurones d'hippocampe en induisant la dépolarisation des circuits à l'aide d'un milieu riche en KCl. Cette dépolarisation induit la relocalisation des granules contenant le transcrit de la *CaMKII α* du corps cellulaire vers les prolongements dendritiques. En effet, le nombre de ces mRNP arborant un mouvement antérograde est légèrement augmenté en présence de KCl (Rook, Lu et al. 2000).

De même, un nombre accru de mRNP ZBP1 sont relocalisés au niveau dendritique suite à cette stimulation. De plus, ZBP1 fut relocalisée au niveau de l'épine synaptique où sa colocalisation avec l'ARNm de l'*actine- β* est augmentée. Le tout fut aboli par un inhibiteur des récepteurs NMDA. Cela suggère que c'est l'activation via cette voie de signalisation qui induit la localisation de ZBP1 (Tiruchinapalli, Oleynikov et al. 2003).

Enfin, il fut démontré que la dépolarisation par le KCl induisait une réorganisation du granule de transport au sein des dendrites et permettait à ceux-ci d'adopter une forme

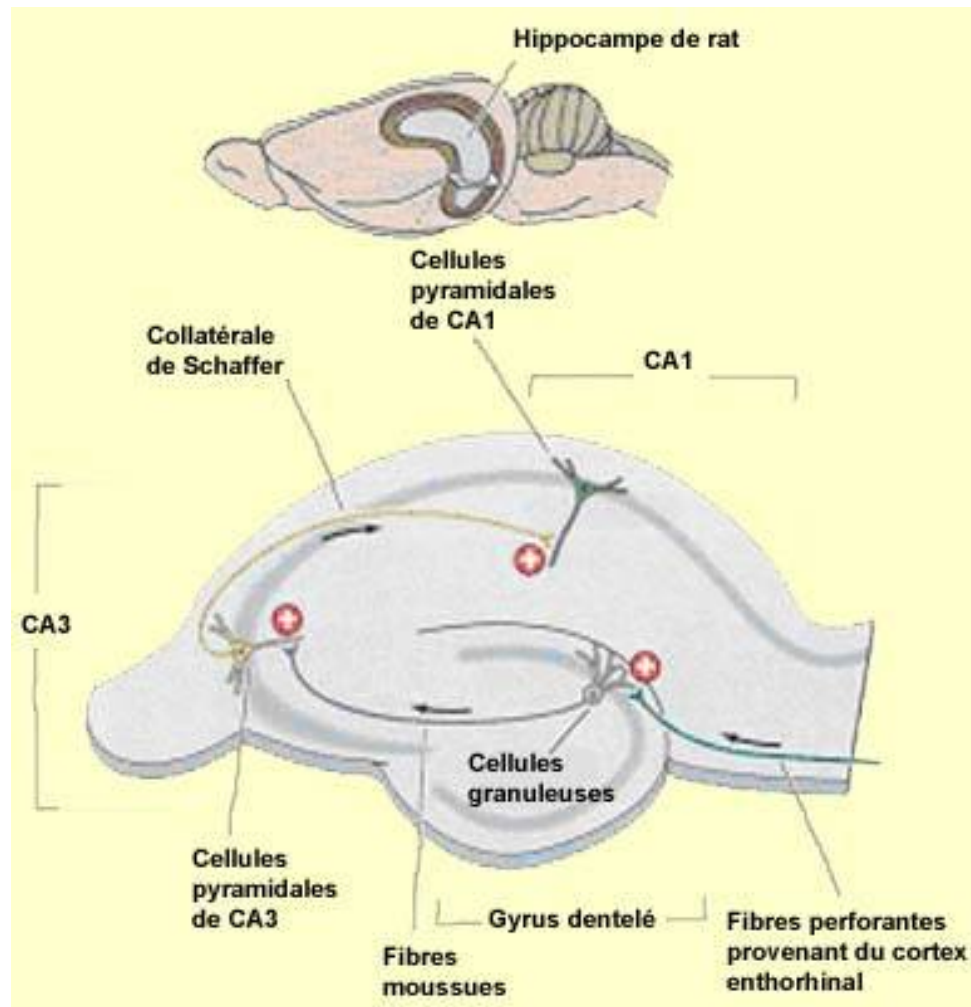


FIGURE 9 : Tranche d'hippocampe en culture

L'hippocampe est une région du cerveau composée de trois principales sections : le gyrus dentelé, la région CA3 et CA1. Il existe également trois circuits principaux de connexions synaptiques faisant intervenir les fibres perforantes des neurones du cortex entorhinal, les fibres moussues des cellules granuleuses et les collatérales de Schaffer des cellules pyramidales CA3.

(http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_07/a_07_cl/a_07_cl_tra/a_07_cl_tra.html)

moins compacte. Certains ARNm se retrouvent alors relocalisés dans la fraction polysomale d'un gradient de sucrose (Krichevsky and Kosik 2001).

2.3.7. La répression traductionnelle lors du transport de l'ARNm

Lors de son transport, la traduction de l'ARNm se doit d'être réprimée, car la présence de certaines protéines dans le mauvais compartiment ou au mauvais moment peut avoir des conséquences désastreuses. Plusieurs protéines liant l'ARN et faisant partie de ces

granules ou particules agissent en tant qu'inhibiteur de la traduction, telles RNG105, ZBP, hnRNP-A2, FMRP, YB1 de même que certains ARN non-codant. Dans cette section, nous discuterons de quelques mécanismes généraux de répression traductionnelle.

2.3.7.1. Répression de la traduction dès la transcription de l'ARNm et rôles des protéines du complexe de l'EJC

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, de nombreuses protéines faisant partie du complexe de transport font également partie du complexe de jonction d'exon-exon ou encore sont associées à l'ARNm uniquement durant la ronde pionnière de traduction. Ce sont là quelques pistes suggérant que ces transcrits n'ont encore jamais été traduits et donc, que la cellule retarde l'activation de la traduction jusqu'au moment où l'ARNm se retrouve bien localisé.

2.3.7.2. Répression de la traduction par absence de queue poly(A) et/ou compétition avec les protéines de la coiffe

L'un des mécanismes permettant de garder un ARNm dormant lors de son transport dendritique est de cliver sa queue poly(A) ou encore de bloquer l'accès à la coiffe, bien entendu pour les ARNm dont la traduction dépend de celle-ci. En effet, l'une des étapes nécessaires à la traduction est la liaison de la protéine PABP à la queue poly(A), ce qui

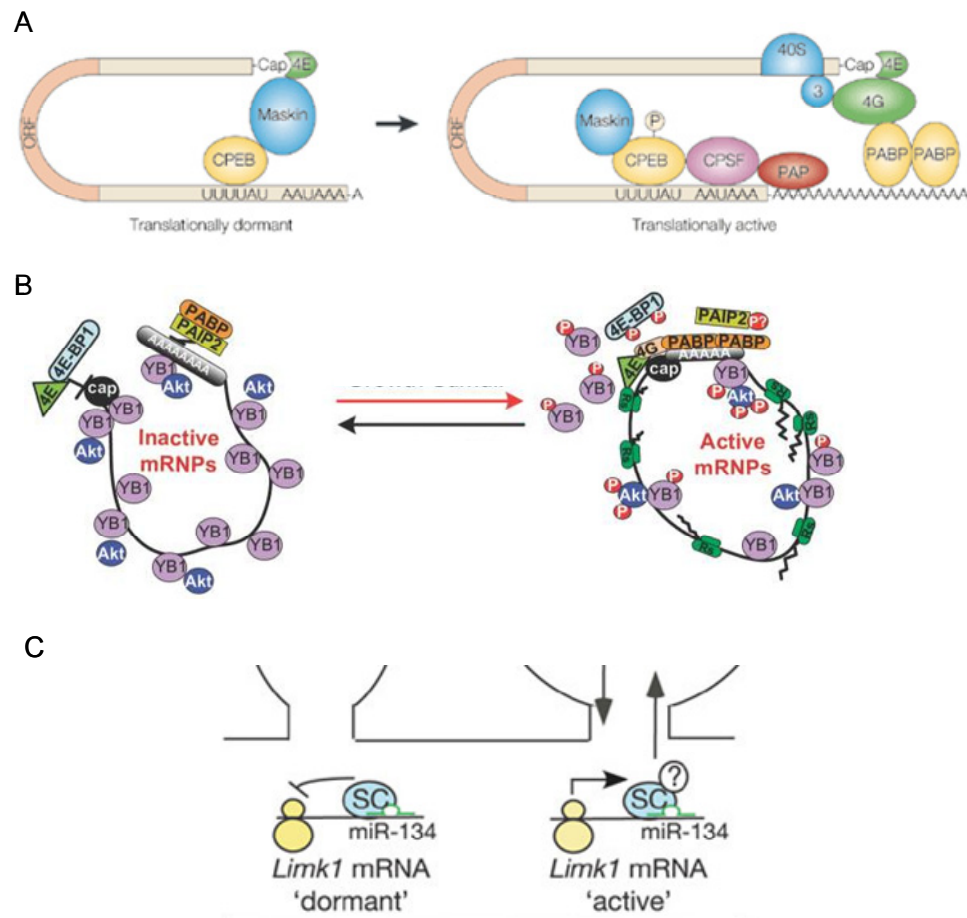


FIGURE 10 : Exemples de mécanismes de répression traductionnelle

A) L'inhibition de la traduction est induite par la présence d'un complexe protéique lié à l'élément CPE de l'ARNm. Il comprend, entre autres, la protéine CPEB. Ce complexe induit à la fois le clivage de la queue poly(A) et prévient la liaison des facteurs d'initiation au niveau de la coiffe. Cette inhibition est soulevée grâce à la phosphorylation de CPEB par les kinases Aurora et CaMKII α . B) Inhibition de la traduction par la liaison de YB1 au niveau de la coiffe de l'ARNm. La levée de l'inhibition est permise suite à la phosphorylation de YB1 par la kinase Akt C) Inhibition de la traduction d'un ARNm par la liaison d'un miRNA dans la région 3'UTR de celui-ci et traduction du transcrit suite à l'activation synaptique. Adaptée de (Mendez and Richter 2001; Evdokimova, Ruzanov et al. 2006; Schratt, Tuebing et al. 2006).

permet la circularisation du transcrit lorsque celle-ci interagit avec les protéines de la coiffe, induisant alors la traduction de l'ARNm.

Donc, une fois arrivé à destination et au moment opportun, un signal de polyadénylation est lancé et l'allongement de la queue poly(A) permettra à l'ARNm silencieux d'être traduit. Les ARNm régulés de cette façon possèdent un élément CPE « cytoplasmic polyadenylation elements » dans leur 3'UTR. Cet élément est lié par la protéine CPEB1 qui recrute à son tour Maskin (une protéine liant eIF4E), Gld2 (une poly(A)-polymérase), Symplekin (une protéine d'échaffaudage) et PARN (une déadénylase). Ce complexe de répression inhibe d'une part l'élongation de la queue poly(A) et de l'autre la liaison de facteurs d'initiation à la coiffe. En effet, maskin se lie également à eIF4E et prévient ainsi la liaison d'eIF4G à eIF4E. (Mendez and Richter 2001)

La levée de l'inhibition est induite lorsqu'il y a phosphorylation de CPEB1. Les kinases impliquées sont Aurora et CaMKII α (Huang, Jung et al. 2002) (Atkins, Nozaki et al. 2004). De nombreux récepteurs neuronaux permettent d'activer la traduction des transcrits maintenus silencieux par ce mécanisme et la population d'ARNm traduits dépendra du type de récepteurs activés (Bramham and Wells 2007).

Ainsi, la phosphorylation de CPEB1 lui permet, d'une part, de se dissocier de PARN, et de l'autre, d'interagir avec la protéine CPSF qui clivera l'ARNm au niveau de la séquence de polyadénylation, ce qui permettra alors à la poly(A)polymérase d'allonger la queue poly(A). L'élongation de la queue induit ensuite la dissociation de maskin et de eIF4E et permet ainsi l'arrivée des facteurs d'initiation de la traduction (Cao and Richter 2002).

Il existe également YB1 qui possède de nombreux rôles dans la régulation de l'ARNm. Il s'agit d'une protéine liant l'ARN capable d'influencer l'état traductionnel d'un ARNm, soit en structurant le mRNP selon le ratio YB1/ARNm où encore en liant la structure de la coiffe (Evdokimova, Ruzanov et al. 2001; Skabkin, Kiselyova et al. 2004).

2.3.7.3. Les miRNA

Les miRNA sont de petits ARN non-codant de 20 à 25 nucléotides se liant en majorité dans le 3'UTR des ARNm, influençant ainsi leur dégradation et/ou traduction via le recrutement du complexe RISC. Avec cette nouvelle avenue, les possibilités de réguler finement la traduction sont immenses. En effet, un miRNA peut se lier sur de nombreux ARNm, et à l'inverse, de nombreux miRNA peuvent se lier sur un même ARNm. La régulation de la traduction d'ARNm dendritique par les miRNA est encore bien peu connue. La LTP induit la surexpression et la sous-expression de plusieurs miRNA (Wibrand, Panja et al. 2010)(Bramham and Wells 2007). Nous discuterons ici de quelques phénomènes synaptiques nécessitant la participation de certains microRNA ou encore de facteurs du complexe RISC.

Dans notre premier exemple, nous avons l'activation du facteur de transcription CREB par le BDNF qui provoque la transcription du miRNA mir-132. Cette expression s'accompagne d'une croissance accrue des neurites. De même, l'inhibition de ce miRNA diminue considérablement le nombre de neurites. L'ARNm de la protéine p250GAP, une protéine de la famille des Rac/Rho, est l'une des cibles de ce miRNA. Cette protéine, enrichie dans le système nerveux central, possède une séquence complémentaire à mir-132 dans son 3'UTR. En effet, mir-132 réduit spécifiquement les niveaux endogènes de p250GAP. De même, son expression est augmentée lorsque l'action de mir-132 est inhibée. L'importance de p250GAP dans la régulation négative de la croissance neuronale fut démontrée lorsque les neurones qui furent soumis à l'inhibition de ce gène, par shRNA, présentèrent une augmentation de la croissance de leurs neurites. Le BDNF provoque donc la croissance des neurites en inhibant l'expression de p250GAP via l'activation CREB-dépendante de la transcription de miR-132 (Vo, Klein et al. 2005).

L'induction de la mémoire à long terme (LTM) chez la drosophile par l'apprentissage olfactif-électrique induit la localisation de l'ARNm *CaMKII α* au niveau

post-synaptique où il est alors traduit. Ce mécanisme est régulé par le complexe RISC, dont l'hélicase Armitage, une protéine nécessaire à la mise en place de la LTM. Celle-ci est localisée à l'épine et dégradée par le protéasome suite à l'induction de la LTM. Ainsi, l'inhibition du complexe RISC, et par conséquent le retrait des miARNs, permettrait la traduction de facteurs nécessaires à la mise en place de la LTM (Ashraf, McLoon et al. 2006). Chez la drosophile, le transcrite de Stau possède en son 3'UTR des sites de liaison pour miR-280 et miR-305. Les niveaux de Stau, CaMKII, et de la kinesin heavy chain se trouvent augmentés lors de l'expression d'un mutant d'Armitage. Il est donc intéressant de supposer que l'induction de la LTM permettrait la traduction du transcrite de dStau en inhibant certains composants du complexe RISC permettant ainsi à dStau de transporter les transcrits nécessaires à la mise en œuvre de la LTM (Ashraf, McLoon et al. 2006).

En terminant, nous discuterons de miR-134, un miRNA spécifiquement exprimé au niveau du cerveau. miR-134 est un régulateur négatif de la taille des épines dendritiques (Schratt, Tuebing et al. 2006). Celui-ci se lie au niveau du 3'UTR de l'ARNm de Limk1 et inhibe la traduction de ce transcrite. Limk1 est une kinase qui phosphoryle les protéines ADF/cofiline, des protéines responsables de la dépolymérisation des filaments d'actine et inhibe ainsi leur action (Yang, Higuchi et al. 1998; Bamburg 1999). L'activation de la synapse par le BDNF a pour conséquence de soulever l'inhibition traductionnelle induite par miR-134, permettant ainsi la traduction de Limk1 qui, à son tour, va pouvoir inhiber les protéines ADF/cofilines et permettre la polymérisation de l'actine au niveau de l'épine synaptique. Le remodelage de l'épine va induire une augmentation de son volume principalement au niveau de la largeur (Schratt, Tuebing et al. 2006).

2.3.8. Qu'arrive-t-il à l'ARNm une fois arrivé à sa destination?

Plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant afin de répondre à cette question. L'ARNm peut être maintenu au site de localisation par différents mécanismes, soit via ancrage par divers facteurs, soit grâce à leur état traductionnel ou encore par un mécanisme

actif qui transporte continuellement les ARNm lorsqu'ils s'éloignent. On en connaît bien peu sur ces mécanismes. Chez le fibroblaste, le facteur d'élongation EF1 α retient l'ARNm aux filaments d'actine et chez le xénope il existe un mécanisme ARN dépendant où les transcrits *VegT* et *Xlsirt* sont impliqués dans l'ancrage de l'ARNm (Lopez de Heredia and Jansen 2004). Nous avons déjà abordé la dégradation généralisée avec l'exemple de l'ARNm de *nanos*. Ce transcrit est protégé et traduit uniquement au pôle postérieur de l'ovocyte. Un tel mécanisme est également possible au niveau neuronal. En effet, l'accumulation du transcrit de *Arc* aux dendrites activées s'accompagne d'une dégradation généralisée du transcrit dans les régions non-activées (Steward and Worley 2001). En résumé, les ARNm peuvent être dégradés, maintenus silencieux ou encore traduits immédiatement à leur arrivé à destination.

2.3.8.1. Dérépression de la traduction

L'induction de la traduction des ARNm peut être déclenchée par une myriade de voies de signalisation agissant sur autant de protéines régulatrices, et ce, à tous les niveaux des diverses étapes de la traduction. Elle dépend autant des structures secondaires présentes dans l'ARNm, du compartiment cellulaire où l'ARNm se trouve que des facteurs protéiques qui lui sont associés. Il s'agit donc là d'un mécanisme très complexe que nous décrirons brièvement.

Les multiples études éparses de même que les nombreux mécanismes employés par le neurone rendent difficiles l'élaboration d'un modèle unique. Dans cette section, nous tenterons bien humblement de mettre en perspective certains grands principes permettant de mieux comprendre la diversité de la régulation traductionnelle au niveau dendritique. Avec ces quelques exemples, nous espérons pouvoir illustrer la diversité des mécanismes employés par le neurone afin de contrôler minutieusement les multiples connexions synaptiques permettant la mise en œuvre des phénomènes tels que la mémoire et l'apprentissage.

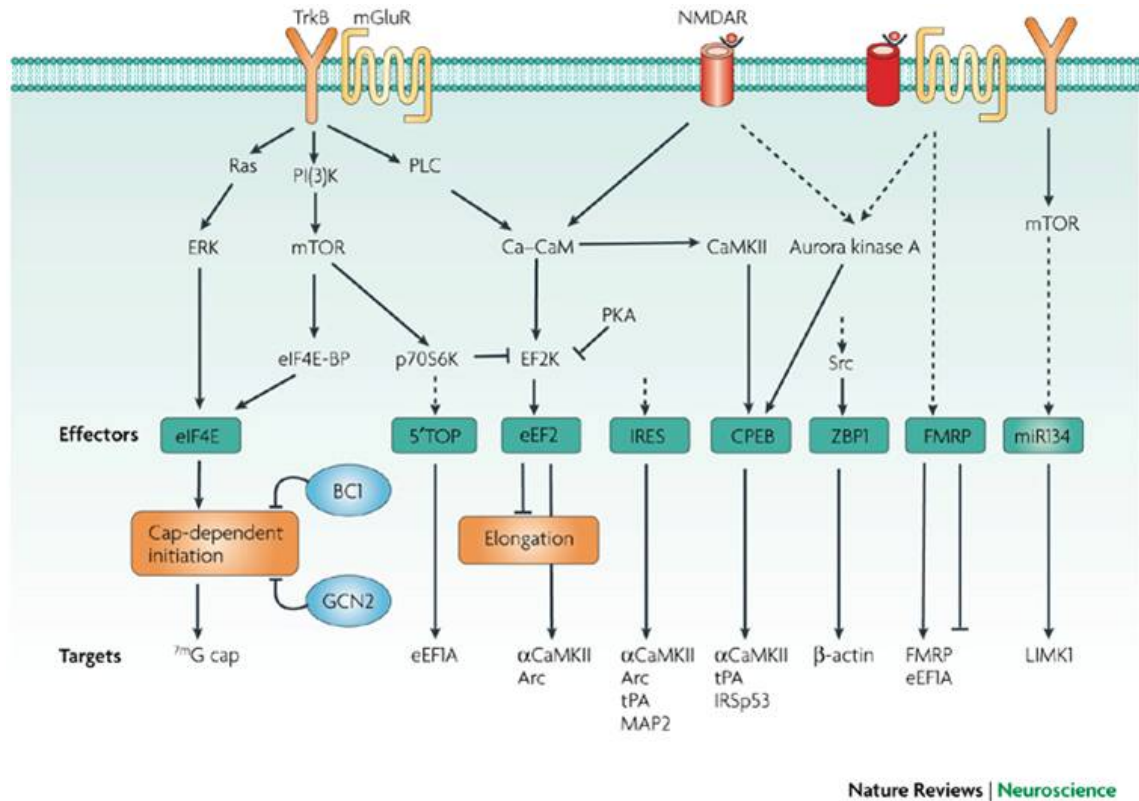


FIGURE 11 : Contrôle de la traduction au niveau de l'épine synaptique

Diverses voies de signalisation, activées par différents neurotransmetteurs, peuvent induire la traduction de certaines classes d'ARNm. (Bramham and Wells 2007)

En bref, la LTP induit la relocalisation de polysomes de la dendrite vers l'épine synaptique, transport qui serait dépendant de la myosine Va, un moteur moléculaire des réseaux d'actine (Bramham and Wells 2007). Il y aurait ensuite traduction des nouveaux ARNm et modification structurale de l'épine activée.

Contrôle traductionnel : Selon l'activation de l'initiation ou de l'élongation

La traduction des transcrits peut être contrôlée à différentes étapes au cours du processus de traduction.

L'élément limitant la traduction d'ARNm possédant une coiffe est principalement le facteur d'initiation eIF4E. Lorsque celui-ci est hyperphosphorylé, il y a augmentation de la traduction de ces ARNm. À l'inverse, l'hypophosphorylation diminue leur traduction (Bramham and Wells 2007).

Il existe deux voies de signalisation dendritique principalement employées afin d'activer cette traduction. Dans un premier temps, l'activation de la kinase ERK permet de phosphoryler et, par le fait même, d'activer eIF4E puis, dans un deuxième temps, il y a la voie de mTOR qui elle permet de phosphoryler et d'inhiber l'inhibiteur de eIF4E, soit eIF4E-BP. Il est difficile de distinguer le rôle de chacune de ces voies dans les mécanismes de LTP et de LTD, car la mise en œuvre de ces phénomènes nécessite l'activation de ces deux kinases. (Bramham and Wells 2007). Il faut souligner qu'il existe également des ARNm dendritiques possédant un IRES et l'inhibition de la voie classique de traduction Cap-dépendante promeut, au contraire, l'expression de ces ARNm (Pinkstaff, Chappell et al. 2001).

La traduction des ARNm localisés peut également être contrôlée au niveau de leur élongation. Lorsque phosphorylé, le facteur d'élongation eEF2 se trouve à inhiber la traduction de la majorité des ARNm. Encore une fois, l'inhibition de cette voie de traduction permet dans un autre temps l'expression protéique de certains ARNm

spécifiques, comme ceux de *Arc* et de *CaMKII α* (Kanhema, Dagestad et al. 2006)(Chotiner, Khorasani et al. 2003).

Contrôle traductionnel : Selon le compartiment dendritique

Non seulement la traduction est-elle contrôlée au cours des différentes étapes de la traduction, mais en plus, celle-ci peut être régulée différemment par un même neurotransmetteur selon le compartiment où se trouve l'ARNm. Par exemple, le BDNF active l'initiation de la traduction au niveau de l'épine de la synapse, en induisant la phosphorylation du facteur eIF4E, et d'autre part, inhibe la traduction au niveau de l'élongation dans le compartiment dendritique à la base des épines, en induisant la phosphorylation d'eEF2. Et ces deux mécanismes sont nécessaires à la mise en place de la LTP (Bramham and Wells 2007).

Contrôle traductionnel : Selon la voie de signalisation activée

De façon sous-entendue, nous avons introduit l'idée que les facteurs de traduction pouvaient être régulés différemment selon la voie de signalisation activée. De plus, la traduction d'un seul ARNm peut être induite par de nombreuses voies de signalisation, par exemple l'activation des récepteurs NMDA, mGluR ou BDNF peut induire l'expression dendritique de la *CaMKII α* (Bramham and Wells 2007). Nous en citerons ici quelques exemples.

Comme nous l'avons mentionné, le BDNF ne peut induire la phosphorylation du facteur eEF2 au niveau de l'épine dendritique, via l'activation de son récepteur TrkB. Par contre, la phosphorylation de ce facteur est possible lorsque ce sont les récepteurs NMDA qui sont activés par leur ligand, le glutamate (Scheetz, Nairn et al. 2000). Cependant, suite à l'activation du récepteur TrkB il y a induction d'une cascade signalétique permettant la dissociation du répresseur RING105 de son ARNm (Tokunaga 2005). Ainsi, les populations d'ARNm traduits diffèrent selon la voie de signalisation empruntée.

Ajoutons que la répression traductionnelle exercée par FMRP sur ces ARNm est soulevée par l'activation des récepteurs métabotrophiques, mGluR. Cette traduction permet la mise en place de la dépression à long terme, LTD, à la synapse activée. L'activité de FMRP est régulée par son état de phosphorylation et il semble que ce soit la déphosphorylation de FMRP qui permette aux ARNm liés par celle-ci d'être redistribués aux polysomes afin d'être traduits (Narayanan, Nalavadi et al. 2007).

Contrôle de la dérépression traductionnelle : Selon l'activité synaptique

L'activité synaptique permet de faire transiter les ARNm des granules silencieux vers les polysomes actifs en traduction. Citons en exemple les ARNm présents dans les granules de Stau1 qui sont libérés de ce complexe et retournés sous forme de polysomes à la suite de l'activité synaptique induite par le KCl (Krichevsky and Kosik 2001).

L'activité synaptique qui active la kinase Src permet la traduction de l'ARNm de l'*actin-β* via la phosphorylation de son répresseur traductionnel, la protéine ZBP1, qui se trouve alors déplacée de l'ARNm (Sasaki, Welshhans et al. 2010 ; Huttelmaier, Zenklusen et al. 2005; Sossin and DesGroseillers 2006).

Il existe au niveau synaptique une activité de base. En effet, de façon régulière, l'extrémité pré-synaptique libère une faible concentration de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Phénomène appelée « miniature excitatory transmission » ou minis. Nous avons mentionné que l'activité synaptique pouvait induire l'expression de certains transcrits, mais il est également possible que l'activité tonique induise, à l'inverse, une répression de la traduction. Les minis agiraient en induisant la phosphorylation du facteur eIF2, qui se comporte alors comme répresseur traductionnel (Bramham and Wells 2007).

2.4. Protéines impliquées dans le transport dendritique d'ARNm

Plusieurs modèles ont été proposés selon l'ARNm, la protéine ou le récepteur étudiés. Nous aborderons dans cette section certaines des protéines étudiées pour leur implication dans le transport dendritique d'ARNm.

2.4.1. CPEB

En plus d'avoir des rôles au niveau traductionnel, l'élément CPE et la protéine CPEB facilitent le transport dendritique des ARNm arborant cet élément. En effet, cet élément est suffisant à lui seul pour induire le transport dendritique d'un rapporteur préalablement non-localisé. De plus, la surexpression de CPEB augmente le transport dendritique d'ARNm endogènes possédant l'élément CPE tel que *MAP2*, *CaMKII α* , *IP3*, alors qu'un dominant négatif de CPEB ou encore l'absence de la protéine dans les neurones de souris KO diminue ce transport. La présence de Maskin au sein du complexe suggère que ces ARNm soient dormants lors de leur transport. Les particules de CPEB se déplacent à une vitesse de 4-8 $\mu\text{m}/\text{min}$ et sont transportées le long des microtubules grâce aux moteurs moléculaires kinésine et dynéine (Huang, Carson et al. 2003).

2.4.2. ELAV (HuB/HuC/HuD)

L'élément cis, ARE, est un élément riche en adénine et uridine situé dans le 3'UTR de plusieurs ARNm. Il s'agit d'un élément d'instabilité permettant à la cellule de modifier rapidement le niveau de ces ARNm suite à un stimulus en permettant soit sa stabilisation, soit sa dégradation. Les protéines de la famille ELAV possèdent trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM et ont la propriété de lier les éléments ARE. Ce faisant, ils stabilisent leurs ARNm cibles. Chez les vertébrés, trois des membres de cette famille, HuB, HuC et HuD sont exprimés spécifiquement dans les neurones alors que HuR est ubiquitaire. (Perrone-Bizzozero and Bolognani 2002)

Les protéines de la famille ELAV ont des rôles importants au niveau du développement neuronal. L'expression de HuD et HuB augmente lors des stades précoces du développement et celle de HuC lors des stades tardifs de la différenciation (Perrone-Bizzozero and Bolognani 2002). De plus, l'expression de HuD augmente dans la région du CA3 de l'hippocampe chez les rats soumis à un protocole d'apprentissage (Bolognani, Merhege et al. 2004). Et tout comme dans le cas de HuD, l'expression ectopique des protéines HuB et HuC dans les cellules PC12 augmente la croissance des neurites (Perrone-Bizzozero and Bolognani 2002). Au contraire, l'absence de la protéine HuD, dans les cellules PC12, inhibe la croissance des neurites. Ce mécanisme fait intervenir PKC qui induit l'export nucléaire des protéines ELAV. Il s'en suit une augmentation de la phosphorylation des protéines ELAV, suivie d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm GAP-43 et enfin d'une augmentation de la traduction du transcrite (Anderson, Morin et al. 2000; Mobarak, Anderson et al. 2000; Anderson, Sengupta et al. 2001).

Les protéines ELAV induisent également la stabilisation de l'ARNm de p21 dont l'expression permet aux précurseurs de se différencier en neurones. La protéine hnRNP-K interagit directement avec HuB/C et le 3'UTR de l'ARNm de p21, antagonisant l'effet de ces dernières. L'équilibre entre ces deux protéines permet aux cellules précurseurs soit de continuer leur prolifération ou soit de se différencier (Yano, Okano et al. 2005).

2.4.3. RNG-105/Caprin-1/RACK

RNG-105 est une protéine qui colocalise avec Stau et les ribosomes. Cette protéine réprime la traduction des ARNm. Celle-ci semble réguler l'association entre les deux sous-unités du ribosome (Shiina, Shinkura et al. 2005; Sossin and DesGroseillers 2006).

RNG-105 est un répresseur traductionnel possédant une boîte RGG, un domaine riche en arginine et glycine, et un domaine riche en glutamine. Cette protéine induit la formation de granules contenant de l'ARNm et des ribosomes. Celle-ci est localisée dans

les dendrites de neurones, mais est absente de l'axone. Un large pourcentage de RNG-105 colocalise avec Stau (71%) et avec l'ARNm de *Camk2 α* (43%). De même, RNG-105 colocalise et coprécipite avec l'ARNm de *BDNF*, *CREB*, *MAP2* et *TrkB* (Shiina, Shinkura et al. 2005).

RNG-105 colocalise également avec eIF4E et PABP. Cependant, l'absence de eIF4G et de EF1a suggère que le granule soit silencieux. Suite à l'activation par le BDNF, RNG-105 se dissocie du granule et eIF4E se voit phosphorylé par Mnk. Ce mécanisme induit de façon très probable l'association eIF4E à eIF4G et permet ainsi la traduction des ARNm réprimés. Aussi, l'ARNm *CaMKII α* , qui normalement cosédimente avec RNG105 sur un gradient, se retrouve dans les fractions correspondant aux polysomes, et dépourvues de RNG105, suite à l'induction au BDNF (Shiina, Shinkura et al. 2005).

2.4.4. ZBP1

Il existe plusieurs orthologues de la famille des "zip code-binding proteins" liant, comme son nom l'indique, l'ARNm au niveau d'une région *cis* appelé "zipcode". Chez l'humain, il s'agit des protéines IMP-1, IMP-2 et IMP-3 (Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein), chez le poulet on parle plutôt des protéines ZBP1 et ZBP2 (zip code-binding protein), alors que chez la souris il s'agit de CRD-BP (coding region determinant-binding protein), enfin chez le xénope on nomme cette protéine Vg1-RBP/Vera (Deshler, Highett et al. 1998; Doyle, Betz et al. 1998; Nielsen, Christiansen et al. 1999). Ces protéines possèdent deux domaines RRM de même que quatre domaines KH permettant leur liaison à l'ARN.

Celles-ci sont responsables du transport et de la stabilité de certains ARNm. Par exemple : Vg1-RBP/Vera est impliqué dans le transport de l'ARNm *Vg1* au pôle végétal de l'ovocyte de drosophile (Deshler, Highett et al. 1998), CRD-BP est pour sa part responsable de la stabilité du transcrite de *c-myc* (Doyle, Betz et al. 1998), la localisation du transcrite de la β -*actin* au niveau des lamellipodes du fibroblaste de même que le transport

de ce même ARNm au niveau dendritique ainsi qu'au niveau des cônes de croissances axonales sont des phénomènes régulés par la protéine ZBP1 (Nielsen, Christiansen et al. 1999; Gu, Pan et al. 2002). Enfin, les protéines IMPs sont impliquées dans l'un ou l'autre des mécanismes de transport, de traduction et de stabilité au niveau des ARNm *H19*, *IGF-II* et *tau* (Ioannidis, Mahaira et al. 2005).

L'un des phénomènes les mieux étudiés au niveau de ces protéines est le transport de l'ARNm de la β -*actin* par la protéine ZBP1. Comme nous venons de le mentionner, ce transport est étudié au sein de trois événements distincts, soit au niveau des lamellipodes de fibroblastes, au niveau du cône de croissance axonal de neurones immatures et enfin au niveau des dendrites de neurones matures.

Le transport du transcrite de la β -*actin* permet, au moment de sa traduction, d'induire la polymérisation des filaments d'actine dans un compartiment bien précis afin de permettre à cette région de modifier sa morphologie (Rafelski and Theriot 2004). Chez le fibroblaste, le transport du transcrite au niveau d'un pôle de la cellule lui permet de se diriger dans cette direction (Lawrence and Singer 1986).

Dans les neurones en développement, l'ARNm de la *actine- β* se doit d'être localisé au niveau des cônes de croissances afin de permettre à ceux-ci de se déplacer vers leurs cibles potentielles. Un phénomène nécessaire à la formation de nouvelles synapses. ZBP1 est l'une des composantes majeures responsables du transport de cet ARNm (Zhang, Eom et al. 2001).

Au niveau des neurones matures, ZBP1 permet la localisation de l'ARNm de la *actine- β* au niveau dendritique de même qu'au niveau de la tête synaptique (Eom, Antar et al. 2003; Tiruchinapalli, Oleynikov et al. 2003). Un phénomène également responsable de la formation de nouvelles synapses. En effet, l'activité neuronale, induite par les neurotrophines, permet la formation de nouveaux prolongements filopodales. Et pour ce faire, l'ARNm de la *actine- β* se doit d'être localisé au niveau dendritique. De plus, la

surexpression de ZBP1 et par le fait même du transport du transcrit de la *actine-β* augmente la formation de ces filopodes alors qu'à l'inverse, des niveaux diminués de ZBP1 et donc du transport dendritique de l'ARNm de la *actine-β* diminuent la formation de ces nouveaux prolongements (Eom, Antar et al. 2003).

La localisation de l'ARNm de la *actine-β* dépend d'une séquence de 54 nucléotides situés au niveau de sa région 3'UTR (Kislauskis, Zhu et al. 1994; Zhang, Eom et al. 2001).

2.4.5. hnRNPA2

Afin d'accélérer le passage de l'influx nerveux au niveau de l'axone, celui-ci est recouvert d'une structure membraneuse appelée gaine de myéline. La gaine de myéline est donc une structure lipidique formée à partir des prolongements membranaires d'une cellule gliale appelée oligodendrocyte. La formation de cette structure est permise en grande partie par l'action de la protéine MBP « myélin binding protein » (Simons and Trotter 2007).

Il est très important de réguler la traduction de cet ARNm dans le temps et dans l'espace afin de structurer correctement la gaine de myéline, et ce, précisément au point de contact entre l'oligodendrocyte et l'axone (Simons and Trotter 2007).

La traduction de celui-ci est donc réprimée lors de son transport le long des prolongements de l'oligodendrocyte. La localisation et la répression traductionnelle de cet ARNm sont permises grâce à la protéine hnRNPA2 qui reconnaît une région en *cis* de 11 nucléotides au niveau du 3'UTR de l'ARNm de la MBP. Une séquence appelée A2RE « A2 response element » (Munro, Magee et al. 1999).

Enfin, la traduction de la MBP est permise via la phosphorylation de hnRNPA2 par la kinase Fyn qui permet de lever cette répression (White, Gonsior et al. 2008).

2.4.6. FMRP

FMRP est une protéine possédant plusieurs domaines de liaison à l'ARN, deux domaines d'homologie à la ribonucléoprotéine K (KH), un domaine riche en acide aminé arginine et glycine (RGG) et un domaine hélice-boucle-hélice-Tudor (Jin, Alisch et al. 2004; Zalfa, Achsel et al. 2006). Le rôle de FMRP est complexe. La liaison de cette protéine aux ARNm inhibe leur traduction. Cependant, FMRP est retrouvée à la fois dans des granules inactifs en traduction et dans des polysomes actifs (Bramham and Wells 2007). De même, dans les souris KO pour FMRP, les transcrits qui lui sont associés sont surexprimés mais certains sont également sous-exprimés.

La maladie du chromosome X Fragile est majoritairement provoquée par l'absence de cette protéine due à l'expansion d'une répétition polymorphique de CGG en 5'UTR du gène. Il s'en suit une hyperméthylation de ces nucléotides créant ainsi des îlots CpG qui aura comme conséquence l'inhibition de la transcription de ce gène. Quelques cas de la maladie ont également été attribués à une protéine aberrante possédant une mutation dans le deuxième domaine KH, où l'asparagine en position 304 est remplacée par une isoleucine (De Boulle, Verkerk et al. 1993; Jin, Alisch et al. 2004; Zalfa, Achsel et al. 2006).

Les neurones de patients atteints de la maladie de l'X Fragile, de même que ceux de l'organisme modèle murin KO pour la protéine FMRP, possèdent plus d'épines dendritiques que les sujets normaux. De plus, ces épines sont de formes majoritairement filopodales, c'est-à-dire plus immatures, minces et allongées que normalement (Irwin, Patel et al. 2001; Nimchinsky, Oberlander et al. 2001). Ces observations correspondent à une augmentation disproportionnée de la mise en place de la LTD. En effet, FMRP est impliquée dans le contrôle de la LTD par un mécanisme très complexe.

L'activation des récepteurs mGluR5 induit la traduction rapide de FMRP. On observe cette augmentation plutôt dans le soma et les dendrites proximales. En effet,

paradoxalement nous observons plutôt une baisse de la concentration de celle-ci au niveau de l'épine synaptique. Cependant, il avait déjà été démontré que l'activation des mGluR induisait une augmentation des niveaux de FMRP à la synapse. Il est donc intéressant de penser que la synthèse se produit bel et bien au niveau de l'épine, mais que la protéine est ensuite transportée de façon rétrograde au corps cellulaire ou encore que les protéines nouvellement synthétisées à l'épine agissent rapidement et sont aussitôt dégradées (Hou, Antion et al. 2006). Cette deuxième hypothèse est appuyée par le fait que l'inhibition du protéasome, et ainsi l'accumulation de FMRP, inhibe la formation de la LTD normalement induite par l'activation des mGluR (Hou, Antion et al. 2006). À l'inverse, comme nous l'avons mentionné la sous-expression de FMRP, dans la maladie de l'X Fragile ou dans les souris KO, induit une augmentation de la mise en œuvre de la LTD.

De plus, FMRP colocalise avec son propre transcrite au niveau dendritique, et ce transport est activé par l'induction des mGluR (Bagni and Greenough 2005). Ainsi, l'activation des récepteurs mGluR permettrait la traduction des transcrits maintenus silencieux par FMRP, dont son propre transcrite *FMRI*. Il y aurait alors augmentation de la concentration de FMRP à l'épine, ce qui permettrait l'inhibition de certains transcrits nécessaire à la LTD. Par la suite, comme nous l'avons mentionné, il y aurait dégradation rapide, au niveau synaptique, de la protéine par le protéasome. La sous-expression de FMRP permettrait donc une trop grande traduction de facteurs induisant la LTD (Bagni and Greenough 2005).

2.4.7. Staufen

Staufen est au cœur du sujet de cette thèse. Il s'agit d'une protéine ayant un rôle clé dans le transport dendritique d'ARNm. Nous discuterons de la structure, de la localisation intracellulaire ainsi que des diverses fonctions reliées à cette protéine dans la section 3.

2.5. Morphologie des épines synaptiques

Les épines synaptiques sont de microcompartiments post-synaptiques, formés au niveau de la dendrite, dont la structure est modifiable selon l'activité synaptique. Cette structure leur permet d'agir en tant qu'unité fonctionnelle en régulant le nombre de récepteurs à leur surface ainsi que la diffusion de facteurs tel le calcium ou encore les protéines nouvellement synthétisées. Nous retrouvons les épines sous différentes formes : filopodale, mince et allongé, courte et trapue « stubby », en forme de champignon ou encore en fer à cheval (Hotulainen and Hoogenraad 2010 ; Harris and Stevens 1989; Hering and Sheng 2001).

De plus, d'ordre général, la forme des épines corrèle avec la force de l'association synaptique. Ainsi, les épines plus minces ayant une plus petite tête synaptique possèdent moins de récepteurs à leur surface et sont associées aux synapses silencieuses, alors que les épines en forme de champignon possèdent une grosse tête, de nombreux facteurs et sont considérées comme étant des épines matures de synapses possédant une grande force d'association (Hotulainen and Hoogenraad 2010 ; Harris and Stevens 1989; Hering and Sheng 2001).

Leur morphologie est grandement dépendante du cytosquelette d'actine et un grand nombre de transcrits localement traduits possèdent un rôle au niveau de la polymérisation ou de la dépolymérisation de ces filaments d'actin (Hotulainen and Hoogenraad 2010). Les phénomènes de plasticité synaptique comme la LTP et la LTD, que nous aborderons dans la section suivante, découlent des modifications morphologiques engendrées au niveau des épines dendritiques (Hotulainen and Hoogenraad 2010).

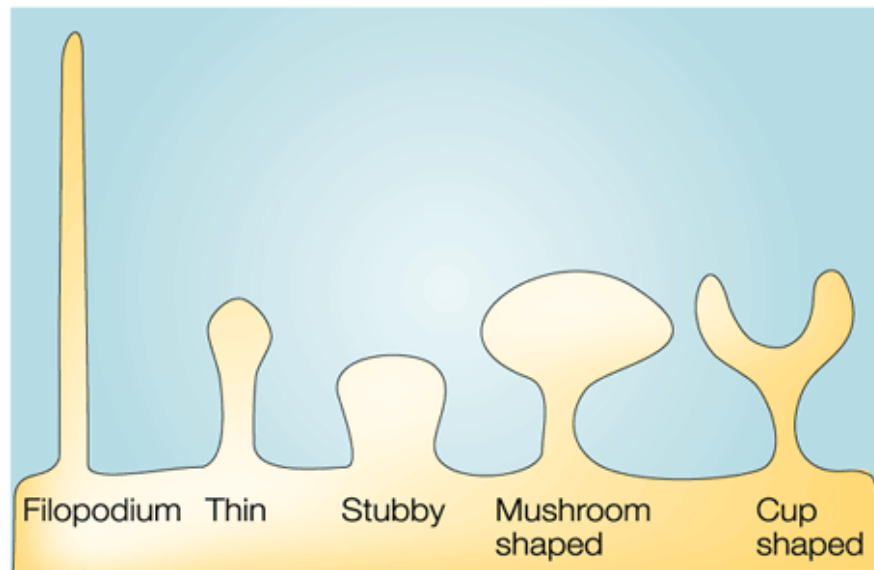


FIGURE 12 : Différentes morphologies adoptées par les épines synaptiques

2.6. Séquence de localisation dendritique

Afin de parvenir à leur destination précise, les ARNm se doivent d'afficher un signal de reconnaissance leur permettant d'être identifiés par les protéines nécessaires à leur bonne localisation cellulaire. Ce signal, allant de quelques nucléotides à plus d'un kb, peut être représenté par une séquence de nucléotides particulière ou encore par une structure d'ARN précise (Jambhekar and Derisi 2007). Selon le modèle utilisé et l'ARNm étudié, la séquence de localisation peut se retrouver à différents endroits au sein du transcrit. De façon générale et presque exclusivement dans le modèle dendritique, ce signal se situe en 3'UTR de l'ARNm.

3. Staufen

Comme nous l'avons brièvement introduit, Staufen est l'une des composantes majeures des complexes ribonucléoprotéiques et le sujet principal de cette thèse. Dans cette section nous décrirons plus en profondeur les divers orthologues, paralogues et isoformes de la protéine de même que leur distribution subcellulaire. Dans la section 4, nous aborderons les différents complexes ribonucléoprotéique de Staufen et enfin, dans la section 5, nous discuterons de son importance dans le transport neuronal de l'ARNm.

3.1. Staufen est une protéine à dsRBD exprimée chez de nombreuses espèces

Staufen est une protéine capable de lier l'ARN. À ce jour, plusieurs rôles lui sont associés : transport, traduction et dégradation d'ARNm. Elle fut d'abord identifiée et caractérisée chez la drosophile. Stau de drosophile possède cinq domaines de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD), dont trois (dsRBD1, dsRBD3 et dsRBD5) comprennent la majorité des acides aminés consensus, alors que les deux autres (dsRBD2, dsRBD4) sont tronqués et conservent les 21 acides aminés de la portion C-terminale du dsRBD. Depuis, divers homologues de la protéine furent identifiés chez de nombreux organismes, dont le rat (Kohrmann, Luo et al. 1999), la souris (Kiebler, Hemraj et al. 1999), le nematode *C. elegans* (Wickham, Duchaine et al. 1999), le xenope (Allison, Czaplinski et al. 2004; Yoon and Mowry 2004), le poisson zébré (Ramasamy, Wang et al. 2006) et l'humain (Wickham, Duchaine et al. 1999). Lorsque nous parlerons de la protéine de façon générale, nous indiquerons simplement Staufen ou Stau, alors que si nous discutons d'un isoforme particulier au sein d'une espèce précise, nous le spécifierons à l'aide du kDa de la protéine

ainsi que de la première lettre de l'espèce. Par exemple : rStau2⁶² pour Staufen2 de rat isoforme de 62kDa. Enfin, les isoformes de souris et de rat sont très semblables et nous les désignerons parfois par mStau ce qui signifie Staufen murin.

3.1.1. Les divers isoformes de la protéine Staufen

Au cours de l'évolution, il y eut duplication du gène et chez les mammifères, entre autres, nous retrouvons les protéines Staufen1 et Staufen2 qui, bien qu'identiques à 50%, sont codées par deux gènes différents. Ces protéines diffèrent par la présence ou non de certains dsRBD. En effet, Stau1 et Stau2 possèdent quatre dsRBD, mais Stau1 ne possède pas le dsRBD1, alors que Stau2 manque le dsRBD5. Dans les deux cas, la longue séquence de l'extrémité N-terminale présente chez dStau est absente. Ces deux gènes peuvent également être soumis à différentes formes d'épissage alternatif créant ainsi différents isoformes des protéines Stau1 et Stau2.

De plus, les divers isoformes Staufen de mammifère, de même que ceux du xénope, disposent d'un domaine de liaison à la tubuline initialement absent de la protéine de drosophile et du nématode.

Enfin, Stau1 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire au sein de différents organes et de nombreuses lignées cellulaires alors que l'expression de Stau2 est prédominante dans le cerveau et le cœur (Duchaine, Hemraj et al. 2002) ; Marión et al., 1999; Wickham et al., 1999; Monshausen et al., 2001).

3.1.2. hStau1

La caractérisation de hStau1 a permis de rapporter une grande identité et similarité de séquence entre hStau1 et dStau1, 38% et 55% respectivement. La similitude est d'autant plus marquée lorsque l'on compare les acides aminés des dsRBD correspondants. En effet,

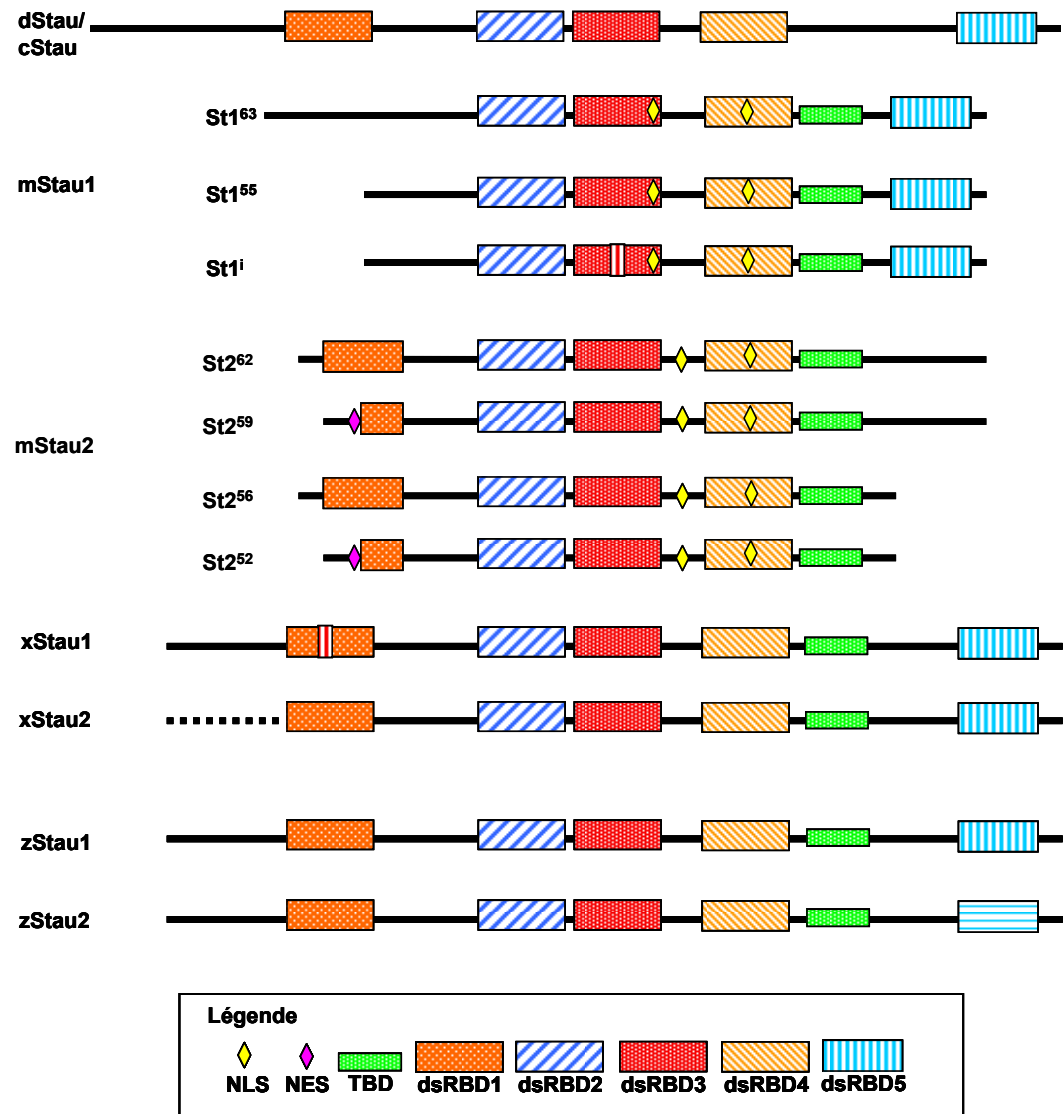


FIGURE 13 : Paralogues et isoformes de Staufen

dStau : Stau de drosophile, cStau : Stau de nématode, mStau : Stau de mammifère, xStau : Stau de xénope, zStau : Stau du poisson zébré. NLS : élément de localisation nucléaire, NES : élément d'export nucléaire, TBD : domaine de liaison à la tubuline.

l'identité de séquence augmente entre 47% et 66%, selon le dsRBD observé (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Ramos, Grunert et al. 2000). Cette observation est beaucoup plus marquée que lorsque l'on compare les dsRBD de d'autres protéines à dsRBD entre eux. En effet, dans ces cas, nous retrouvons une identité de séquence de l'ordre de 29% (St Johnston, Brown et al. 1992). Ainsi, les divers orthologues de la protéine Stau sont demeurés relativement semblables au cours de l'évolution.

hStau1 est présente sous forme d'un gène unique positionné au centre du long bras du chromosome 20 dans la région q13.1. (Wickham, Duchaine et al. 1999) Il s'étend sur près de 65 kb, correspondant à 15 exons. Le clonage de hStau1 a permis d'identifier la présence de quatre transcrits, dont trois produisent une protéine de 55 kDa. Le quatrième arbore un exon additionnel à l'extrémité N-terminale, introduisant ainsi un nouveau site d'initiation de la traduction et produisant alors une protéine de 63 kDa (Wickham, Duchaine et al. 1999). Donc, chez hStau, contrairement à mStau, trois exons permettent un épissage alternatif en N-terminal de la protéine, d'où la présence des quatre transcrits (Brizard, Luo et al. 2000).

Les premières études *in vitro* démontrèrent que hStau et mStau avaient la capacité de lier l'ARN double-brin sans spécificité de séquence (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999), tout comme d'autres protéines à dsRBD (St Johnston, Brown et al. 1992; Gagnon, Buckler et al. 1993). Cependant, chacun des dsRBD ne lie pas l'ARN avec la même affinité. Le dsRBD3 montre la plus forte association à l'ARN double-brin, alors que le dsRBD4 montre moins d'affinité et que les dsRBD2 et dsRBD5 sont dépourvus d'activité de liaison à l'ARN (Wickham, Duchaine et al. 1999).

Finalement, le domaine de liaison à la tubuline (TBD) de hStau et mStau possède bel et bien la faculté de lier spécifiquement la tubuline (Wickham, Duchaine et al. 1999). Seul, il n'est cependant pas suffisant pour ancrer Stau au cytosquelette (Wickham, Duchaine et al. 1999).

3.1.3. mStau1 et mStauⁱ

hStau1 et mStau1 sont identiques à 90% et similaires à 98%. Chez la souris, Staufen1 est également transcrite à partir d'un seul et unique gène de 12 exons étalé sur 17 kb au niveau du chromosome 2 (Duchaine, Wang et al. 2000).

La caractérisation de cette séquence génomique mit en relief la présence de deux sites accepteurs d'épissage au niveau du dsRBD3, ce qui induit la transcription d'un isoforme arborant une insertion additionnelle de 18 paires de bases. Cet isoforme fut baptisé mStauⁱ. Une telle organisation est conservée au sein du règne mammifère (Duchaine, Wang et al. 2000).

L'insertion de ces acides aminés se situe au sein du premier feuillet bêta de la structure du dsRBD3, α - β - β - α , et interfère avec la capacité de ce domaine à lier l'ARN (Duchaine, Wang et al. 2000). mStauⁱ semble moduler les niveaux d'ARN présents dans le complexe de mStau1. En effet, les niveaux d'ARN retrouvés suite à l'IP de mStau1 sont de loin inférieurs dans les cellules surexprimant mStauⁱ par rapport à celles exprimant mStau1 (Duchaine, Wang et al. 2000).

3.1.4. Isoforme spécifique à l'oligodendrocyte

L'oligodendrocyte semble permettre l'expression d'un variant d'épissage de l'isoforme de Staufen1 encore jamais rapporté de 49 kDa, nommé Staufen $\Delta E9i$. Son expression est permise grâce à l'ajout d'un intron induisant un framshift +2 et conférant ainsi au transcrit un codon stop prématuré (Thomas, Martinez Tosar et al. 2005).

3.1.5. rStau1 et rStauⁱ

Pour sa part, rStau1 possède 48% d'identité et 71% de similarité avec dStau. Cependant, la correspondance augmente jusqu'à 92% d'identité et 96% de similarité avec

l'orthologue hStau1 ainsi qu'avec mStau1 où il y a 98% d'identité et 99% de similarité (Kohrmann, Luo et al. 1999; Monshausen, Putz et al. 2001).

Un isoforme semblable à mStau¹ fut également identifié chez le rat. En voulant identifier la totalité de la séquence codant pour Stau chez le rat, ces chercheurs identifièrent une variante d'épissage du gène de Stau permettant l'insertion de six acides aminés au sein du dsRBD3 (Monshausen, Putz et al. 2001). Il fut intéressant de remarquer que cette insertion diminua également de façon drastique l'efficacité de liaison à l'ARN de la protéine (Monshausen, Putz et al. 2001).

3.1.6. rStau2 et mStau2

Les homologues de Stau2 furent également étudiés chez les autres espèces, entre autres chez le rat et la souris. Les dsRBD de rStau2 sont similaires à 47-59% aux dsRBD de dStau (Tang, Meulemans et al. 2001). Et les protéines humaines et murines de Stau2 possèdent une identité de séquence de 92% (Duchaine, Hemraj et al. 2002).

Chez la souris et le rat, le gène de Stau2 produit quatre transcrits d'ARN par épissage alternatif. Il existe deux sites d'initiation de la traduction situés sur deux exons différents. Ceci confère aux isoformes mStau2⁶² et mStau2⁵⁶ une extrémité N-terminale plus allongée alors que celle des isoformes de mStau2⁵⁹ et de mStau2⁵² est plus courte. Cependant, il y a addition à cette extrémité N-terminale tronquée de 6 aa uniques. Pour ce qui est de l'extrémité C-terminale, les isoformes mStau2⁵² et mStau2⁵⁶ possèdent un codon de terminaison précoce et donc une extrémité C-terminale tronquée comparativement aux isoformes mStau2⁶² et mStau2⁵⁹. Ces résultats sont en accord avec les transcrits retrouvés chez l'humain (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Monshausen, Gehring et al. 2004).

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, contrairement à Staufen1, Staufen2 possède le dsRBD1 présent dans le gène de drosophile. Cependant, les isoformes mStau2⁵⁹ et mStau2⁵² ne possèdent qu'un dsRBD1 tronqué, contrairement aux isoformes mStau2⁵⁶ et

mStau2⁶² qui possèdent un dsRBD1 complet. Finalement, le TBD est également présent au sein des divers isoformes de mStau2 (Duchaine, Hemraj et al. 2002).

En accord avec les résultats observés chez Stau1, le dsRBD3 est le principal domaine de liaison à l'ARN et le dsRBD4 a la capacité de lier faiblement l'ARN. Alors que ni le dsRBD1, le dsRBD2 ou la région C-terminale n'ont pas la capacité de lier l'ARN (Duchaine, Hemraj et al. 2002).

3.1.7. xStau1 et xStau2

Il existe également chez le xénope les orthologues de Stau1 et de Stau2. Il est intéressant de constater que chez cette espèce, à la fois xStau1 et xStau2 possèdent les cinq dsRBDs présents originalement chez la drosophile. Cependant, seul le dsRBD1 de xStau1 possède une insertion de 23 acides aminés, dans la boucle séparant les feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$. (Allison, Czaplinski et al. 2004). Le dsRBD5 de xStau2 est comparable aux dsRBD5 de Stau1 et de dStau.

XStau1 montre plus de 75% d'identité avec Stau1 et 45% avec Stau2 de mammifère. Alors que xStau2 possède environ 70% d'identité avec Stau2 et 40% avec Stau1 de mammifère (Allison, Czaplinski et al. 2004; Yoon and Mowry 2004). Encore une fois, cette similitude de séquence est plus prononcée lorsque l'on compare les dsRBD ainsi que le TBD comparativement au reste de la protéine. Il faut remarquer que le TBD possède cependant une identité de séquence plus faible que les dsRBD (Yoon and Mowry 2004).

Regardons rapidement la portion N-terminale de ces deux protéines. La longue portion N-terminale présente chez la drosophile, mais absente chez les protéines de mammifère est également absente chez les orthologues de xénope. Cependant, xStau1 possède tout de même une extrémité N-terminale beaucoup plus longue que celle présente chez la majorité des isoformes de mammifères. Elle est de l'ordre de celle que l'on retrouve chez mStau1⁶³ (Allison, Czaplinski et al. 2004). Pour ce qui est de la portion N-terminale

de xStau2, elle n'est point retrouvée chez son homologue de mammifère. Il semble qu'il s'agisse d'une séquence unique à Stau2 d'amphibien.

3.1.8. *zStau1 et zStau2*

zStau1 et zStau2 possèdent également toutes deux les cinq dsRBD (Ramasamy, Wang et al. 2006). Cependant, la partie C-terminale de zStau2 est plus comparable à celle de mStau2 et hStau2 qu'à celle de m/hStau1 ou dStau, contrairement à xStau2. zStau1 et zStau2 sont semblables à 67% et 74% aux orthologues de mammifères respectivement et à 44% entre elles (Ramasamy, Wang et al. 2006).

3.2. Staufen est une protéine possédant plusieurs domaines dsRBD

Comme nous l'avons mentionné, Staufen est une protéine ayant comme domaine de liaison à l'ARN le dsRBD. Dans cette section, nous définirons brièvement ce qu'est un dsRBD.

3.2.1. *Le dsRBD (domaine de liaison à l'ARN double-brin)*

Comme le suggère son appellation, le domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD) permet à une protéine de lier l'ARN qui possède une structure secondaire d'ARN double-brin. La fonction des protéines possédant de tels domaines est très variée, allant du transport de l'ARNm (Staufen/XlrpbA) au contrôle de la traduction (Staufen/RHA/PKR/PACT/TRBP) en passant par le clivage (RNaseIII/Dicer/Drosha), l'édition (ADAR1/ADAR2) et même la transcription (RHA/NF90) d'ARNm.

Il s'agit d'un domaine d'environ 70 acides aminés formé d'une hélice alpha, de trois feuillets bêta anti-parallèles suivis d'une hélice alpha. Nous retrouvons les deux hélices alpha appuyées contre la plateforme formée par les feuillets bêta. Il existe deux catégories

de dsRBD. Le type A possède la très grande majorité des acides aminés consensus alors que le type B est tronqué et ne possède qu'une région consensus dans son C-terminal. Le dsRBD de type B possède une faible affinité pour l'ARN, voire même aucune (Doyle and Jantsch 2002).

Les études de cristallographie et de RMN ont montré que les dsRBD interagissaient avec l'ARN via deux sillons mineurs successifs et le sillon majeur disposé entre ceux-ci. La liaison à ces structures pourrait expliquer la spécificité de liaison des dsRBD pour l'ARN double-brin versus l'ARN simple brin. La liaison de l'ARN double-brin par le dsRBD se fait uniquement via son squelette sucre-phosphate. En effet, il y a absence d'interaction entre le dsRBD et les bases nucléotidiques de l'ARN, ce qui suggère que ce n'est pas tant la séquence nucléotidique précise qui est responsable de la spécificité de liaison, mais plutôt la forme de la structure qui en résulte (Ryter and Schultz 1998; Ramos, Bayer et al. 1999; Ramos, Grunert et al. 2000; Doyle and Jantsch 2002).

Les boucles 2 et 4 sont les principaux déterminants de reconnaissance du dsRBD3 de Staufen. Le premier reconnaît le sillon mineur et le second reconnaît le squelette phosphodiester du sillon majeur adjacent d'un ARN double-brin de forme-A. L'hélice alpha-1 joue également un rôle dans la liaison, en faisant contact avec le squelette phosphodiester de l'ARN. Il est à noter que la longueur minimale de la tige boucle liée par Staufen est de 12 paires de bases (Ramos, Grunert et al. 2000).

3.2.2. Spécificité de liaison des protéines à dsRBD

ADAR est une protéine à dsRBD possédant une spécificité de séquence *in vitro*, ce qui suggère que certaines de ces protéines n'ont besoin d'aucun partenaire afin de trouver leurs cibles d'ARNm (Hurst, Hough et al. 1995). Cependant, la majorité des protéines à dsRBD, dont Staufen, ne possèdent pas de spécificité de séquence *in vitro*, ce qui suggère qu'elles requièrent d'autres facteurs afin de médier à leur spécificité.

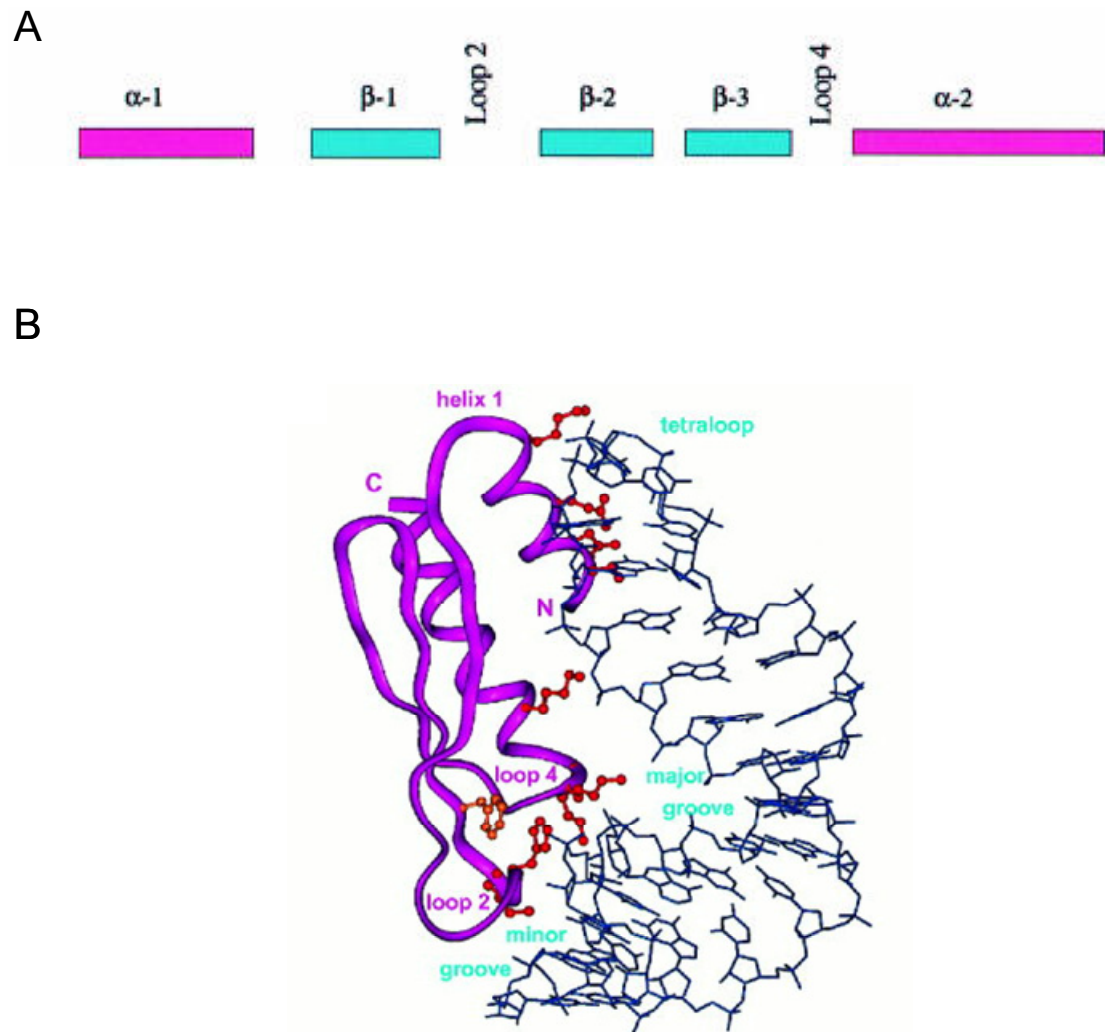


FIGURE 14 : Domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD)

A) Organisation en domaine du dsRBD : une hélice alpha suivie de trois feuillets bêta et d'une autre hélice-alpha. B) Structure du dsRBD3 de dStau en complexe avec l'ARN double-brin. Adaptée de (Ramos, Bayer et al. 1999; Ramos, Grunert et al. 2000)

Aussi, ADAR1 et ADAR2 possèdent des cibles communes d'ARN de même que certaines particularités spécifiques à chacune. Ainsi, il semble possible que différentes protéines à dsRBD puissent reconnaître différentes populations d'ARN (Lehmann and Bass 2000).

Voici un exemple de cette spécificité de liaison. Chez le xénope, il est possible de voir le recrutement de la protéine ADAR1 aux différentes boucles de transcription, situées sur les chromosomes de l'ovocyte. La localisation d'ADAR dépend de ses dsRBD. En effet, l'absence de dsRBD l'empêche d'être recrutée au chromosome et une construction remplaçant les trois différents dsRBD de la protéine par un même dsRBD permet une localisation chromosomale différente de la protéine wt (Doyle and Jantsch 2002). Cela suggère que différents dsRBD peuvent reconnaître différents ARNm et localiser la protéine en conséquence.

De même, lorsque les deux premiers dsRBD d'ADAR1 furent remplacés par ceux de PKR, la protéine ne reconnaissait alors plus ses substrats habituels. De plus, un ARN antagoniste spécifique à PKR fut, dans ces conditions, un inhibiteur du mutant ADAR1 (Doyle and Jantsch 2002). Cela suggère qu'un dsRBD sorti hors de son contexte a la possibilité de conserver sa spécificité de séquence.

Ces résultats indiquent qu'il est possible pour les paralogues Staufen1 et Staufen2 d'avoir des cibles d'ARNm différentes. Il s'agit là de l'une des questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans cette thèse.

3.3. La localisation intracellulaire de mStaufen et son association aux divers organites

Stau1 et Stau2 adoptent une localisation intracellulaire en apparence très similaire, soit une distribution somatodendritique, périnucléaire avec faible localisation nucléaire, en association au réticulum endoplasmique rugueux (RER) et aux microtubules. Cependant, chacune d'elle possède ses particularités propres. En effet, elles font partie de complexes ribonucléoprotéiques distincts (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002).

3.3.1. Réticulum endoplasmique rugueux

Stau est localisée à la région périnucléaire du cytoplasme en association à des structures vésiculaires et tubulaires non solubilisées par les détergents (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Kohrmann, Luo et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Wang et al. 2000).

Un premier indice de l'association de Stau au réticulum endoplasmique fut dévoilé en microscopie électronique, où l'on démontra la colocalisation de rStau1 avec des structures tubulaires représentant très probablement le réticulum endoplasmique. (Kohrmann, Luo et al. 1999) Ces résultats furent confirmés en immunofluorescence par la colocalisation de rStau1 avec la ribophorin I, un marqueur du RER (Kohrmann, Luo et al. 1999).

En accord avec ces résultats, des études en cellules HeLa et COS7 permirent de visualiser hStau1 et/ou mStau1 colocalisant avec plusieurs marqueurs du réticulum, soit la calréticuline, la protéine Bip, la ribophorinI et la calnexine. De plus, on observa une association exclusive de Stau1 avec les marqueurs plus spécifiques du réticulum

endoplasmique rugueux, soit la ribophorinI et la calnexine (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Kohrmann, Luo et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Wang et al. 2000).

En faible concentration, l'isoforme mStauⁱ-GFP possède une distribution semblable à mStau1, soit tubulovésiculaire, quoiqu'il arbore une localisation plus périnucléaire et moins en périphérie de la cellule que mStau1. Cependant, lorsqu'elle est surexprimée il y a alors formation de gros complexes cytoplasmiques. Cette observation semble indiquer que le ratio entre mStauⁱ et mStau1 est important pour la localisation au RE de mStauⁱ (Duchaine, Wang et al. 2000).

3.3.2. Ribosome

Plusieurs études ont démontré le cofractionnement de Stau avec les ribosomes (Luo, Duchaine et al. 2002; Ohashi, Koike et al. 2002; Brendel, Rehbein et al. 2004; Yoon and Mowry 2004). Stau1 est associée à la fois au ribosome intact, ainsi qu'à chacune de ses sous-unités, 40 et 60S. En effet, sur un gradient de saccharose 22-60%, hStau⁵⁵ est majoritairement présente dans la fraction ribosomale. De plus, lorsque les différentes sous-unités ribosomiques sont séparées, sur un gradient 10-40%, elle est retrouvée en association avec les deux sous-unités (Luo, Duchaine et al. 2002). Il est difficile d'identifier un domaine unique d'association au ribosome. En effet, plusieurs combinaisons sont possibles afin de permettre l'association aux ribosomes. Il faut retenir que le dsRBD3 est le principal déterminant de la stabilisation de l'interaction. Cependant, seul, il ne peut permettre l'association au ribosome. Par contre, la structure correspondant au dsRBD4 en combinaison avec le TBD, est suffisante pour l'association au ribosome et l'ajout du dsRBD3 renforce grandement cette association. L'association serait donc à la fois ARN dépendante comme le montre l'importance du dsRBD3 et dépendante des interactions protéines-protéines via le dsRBD4-TBD (Luo, Duchaine et al. 2002).

Stau2 est également retrouvée en association avec les deux sous-unités ribosomiques. Lorsque séparés sur un gradient de saccharose 20-60%, plus de 70% de

Stau2⁵⁹ et Stau2⁵² sont retrouvées dans les fractions correspondant aux pics de ribosomes, alors que les 30% restants sont associées à des complexes de plus grandes densités contenant peu de ribosome. De même, sur un gradient 10-40% permettant la séparation des sous-unités ribosomiques, Stau2⁵⁹ et Stau2⁵² sont retrouvées avec les deux sous-unités ribosomiques (Duchaine, Hemraj et al. 2002). De plus, l'IP de Stau2 permet d'isoler la protéine ribosomale P0 et l'ARNr 18S. (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Ceci confirme la présence de certains composants ribosomiques en complexe avec Stau2 et suggère un rôle possible de Stau2 au niveau de la traduction dendritique (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Il est intéressant de constater que lorsque les neurones sont soumis à un traitement avec inhibiteur de la traduction, qu'il agisse au niveau de l'initiation ou de l'élongation, Stau2⁵⁹ et Stau2⁵² sont toujours présentes dans la fraction ribosomale. Il semble donc que l'état de traduction n'influence pas l'association de Stau au ribosome (Duchaine, Hemraj et al. 2002).

Par contre, Stau2⁶² est retrouvée dans les fractions légères du gradient de saccharose, ce qui suggère qu'elle ne soit pas associée aux ribosomes (Duchaine, Hemraj et al. 2002). De plus, suite à l'immunoprécipitation du ribosome, nous retrouvons Stau2⁵⁹, mais non Stau2⁶². Mentionnons que la présence de Stau2⁵² n'est pas observée, car elle migre avec les anticorps (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Ces observations suggèrent que les divers isoformes de la protéine Stau2 font partie de différents complexes ribonucléoprotéiques. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si ceux-ci étaient associés aux même transcrits d'ARNm ou, au contraire, à des populations distinctes.

3.3.3. Golgi et voie de l'endocytose

La colocalisation avec l'appareil de Golgi fut légèrement contradictoire. Mentionnons cependant que deux marqueurs différents dans deux types cellulaires différents furent utilisés. Les premiers chercheurs ne voyaient aucune colocalisation entre rStau1 et le marqueur du trans-Golgi TGN38 dans les neurones d'hippocampes (Kohrmann,

Luo et al. 1999). Les seconds observèrent une colocalisation partielle, mais non traditionnelle entre hStau1 et le marqueur de l'appareil de Golgi, mannII, dans les cellules HeLa (Marion, Fortes et al. 1999). Depuis, aucune étude n'a démontré l'association entre Stau1 ou Stau2 et l'appareil de Golgi. De plus, il n'y a aucune colocalisation entre Stau1 et la voie de l'encocytose, représentée par la protéine lamp2 (Marion, Fortes et al. 1999).

Par contre, les protéines du complexe ESCRT-II chez la drosophile, complexe responsable de cibler les protéines ubiquitinées aux endosomes, sont également responsables de la phase finale de localisation du transcrit de *bicoid* au pôle antérieur, un transport nécessitant la participation de la protéine Stau. Cependant, cette localisation est indépendante de la fonction du complexe dans le transport des vésicules endosomales (Irion and St Johnston 2007).

3.3.4. *Microtubules*

L'association de Stau aux microtubules fut confirmée à de nombreuses reprises. Le point de départ fut l'observation en microscopie électronique d'environ 96% des complexes de rStau1 en forte proximité avec les microtubules, soit à moins de 18 nm. Cela suggéra pour la première fois une association entre Stau et les microtubules (Kohrmann, Luo et al. 1999). Depuis, la présence d'une région homologue au domaine de liaison de la tubuline de MAP1B fut identifiée entre les dsRBD4 et dsRBD5. Des études de liaison confirmèrent la capacité de ce domaine à lier la tubuline *in vitro* (Wickham, Duchaine et al. 1999).

Lors d'études de fractionnement, les divers orthologues de Stau1 et Stau2 furent retrouvés majoritairement en association avec la fraction comprenant le cytosquelette (Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002). Cependant, malgré la capacité du TBD à lier la tubuline, ce domaine seul n'est pas suffisant pour ancrer Stau au cytosquelette et le rendre de ce fait insoluble (Wickham, Duchaine et al. 1999).

3.3.5. Localisation neuronale

Au niveau du neurone, rStau1 arbore une distribution somatodendritique. En effet, au début du développement neuronal, rStau est présente au sein des nombreuses neurites correspondant au stade de développement 1-3. Puis, alors que la spécialisation des neurites se poursuit pour se définir soit en dendrites ou soit en axones aux stades 4-5, Stau devient exclusivement dendritique. Cette distribution fut observée en immunofluorescence ainsi qu'en microscopie électronique (Kohrmann, Luo et al. 1999). Cette distribution est sensiblement la même pour les divers orthologues et isoformes de Stau1 et Stau2 (Monshausen, Putz et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002). Nous discuterons beaucoup plus en détail du transport et de la localisation dendritique de Stau1 et Stau2 dans les sections qui suivent.

3.3.6. Transit nucléaire

3.3.6.1. Staufen1

Aux cours de diverses expériences, on observa Stau1 en très faible concentration au sein du noyau et/ou du nucléole (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Ramos, Grunert et al. 2000; Allison, Czaplinski et al. 2004). Depuis, des études plus approfondies ont exposé le transit nucléo-cytoplasmique de la protéine. La localisation nucléaire et nucléolaire de Stau1 est très complexe et chaque dsRBD, chaque région inter-dsRBD influencent sa distribution. Comme nous l'avons mentionné, Stau1 arbore une localisation majoritairement cytoplasmique. Cette distribution est due à la rétention au cytoplasme de la protéine grâce, notamment, à son dsRBD3, ainsi qu'à la participation du dsRBD2.

Deux séquences de localisation nucléaire furent identifiées, l'une située à l'extrémité C-terminale du dsRBD3, un NLS bipartite, et l'autre au centre du dsRBD4, un NLS basique (Martel, Macchi et al. 2006).

La localisation nucléolaire est permise grâce au dsRBD3 et au NLS bipartite. D'une part, le transit nucléolaire dépend d'une structure de dsRBD3 intacte. En effet, l'altération de la structure du dsRBD3 induit l'accumulation de Stau1 au nucléole alors que ce n'est pas le cas lorsque seule la fonction de liaison du dsRBD3 est compromise. Dans un deuxième temps, le NLS bipartite, plus précisément sa composition en acides aminés basiques, joue un rôle primordial dans la localisation nucléolaire de la protéine (Martel, Macchi et al. 2006).

Enfin, l'export de Stau1 semble indépendant de CRM1 et d'exportine-5, deux récepteurs d'export nucléaire bien connus. Ces résultats sont à l'inverse de ce que l'on observe avec Stau2 (voir section 3.3.6.2). L'export de la protéine ne semble pas non plus dépendre de la présence de nouveaux transcrits, car ni l'inhibition de la l'ARN polymérase I, II ou III n'induit l'accumulation de Stau au noyau (Martel, Macchi et al. 2006).

3.3.6.2. Staufen2

Deux études menées en parallèle démontrèrent la capacité de Stau2 à transiter au noyau. En effet, Stau2 étant principalement retrouvée dans le cytoplasme du neurone, sa localisation nucléaire était mise en doute.

Il fut finalement démontré que lorsque le principal domaine de liaison à l'ARN de Stau2, le dsRBD3, est muté (stau2-dsRBD3*) et ainsi rendu inapte à lier l'ARN, Stau2 se retrouve alors accumulée dans le noyau de la cellule. De plus, cette accumulation est majoritairement nucléolaire (Macchi, Brownawell et al. 2004; Miki and Yoneda 2004). En fait, cette observation diverge entre les deux équipes. En effet, une première étude, effectuée dans les cellules BHK, démontra que les deux principaux isoformes de Stau2,

Stau2⁶² et Stau2⁵⁹, se retrouvaient accumulés au noyau suite à la mutation de leur dsRBD3. Alors qu'une deuxième équipe démontra, dans les cellules HeLa, que seule Stau2⁶² se trouvait ainsi accumulée tandis que Stau2⁵⁹ demeurait cytoplasmique malgré cette mutation (Macchi, Brownawell et al. 2004; Miki and Yoneda 2004).

Ceci indique, du moins pour l'isoforme de Stau2⁶², que Stau2 doit lier son ARNm afin d'être exportée du noyau. Ces résultats diffèrent de ceux observés chez la drosophile où un mutant de dStau, ne pouvant plus lier l'ARN, ne se retrouve pas au noyau, mais demeure toujours cytoplasmique.

Par analyse informatique, deux domaines de localisation nucléaires (NLS) furent identifiés, l'un entre le dsRBD3 et le dsRBD4 et le second au sein du dsRBD4. Lorsque le premier NLS fut muté, la protéine Stau2-dsRBD3*-NLS* ne se retrouva alors plus accumulée dans le noyau (Macchi, Brownawell et al. 2004; Miki and Yoneda 2004). Ceci s'explique par le fait que la protéine ne possède tout simplement plus la capacité d'entrer au noyau. Le NLS bipartite retrouvé entre le dsRBD3 et le dsRBD4 est bien responsable de la localisation nucléaire. Cependant, il n'est pas suffisant à la localisation nucléolaire de Stau2. Pour ce faire, la présence d'un dsRBD3 intact est nécessaire (Macchi, Brownawell et al. 2004).

Stau2⁶² et Stau2⁵⁹ possèdent un mécanisme d'export nucléaire commun qui dépend du facteur exportine-5. Cependant, alors que l'export de Stau⁶² dépend uniquement d'exportine-5, l'export de Stau⁵⁹ se voit également effectué via CRM1. En effet, seul Stau2⁶² se trouve au noyau suite à la sous-expression de l'exportine-5 par siRNA. Cela indique que Stau2⁵⁹ possède une seconde voie de sortie (Macchi, Brownawell et al. 2004). En effet, un épissage alternatif à son extrémité N-terminale confère à Stau2⁵⁹ l'addition de 6aa contenant l'élément spécifique lui permettant d'être exportée via CRM1 (Macchi, Brownawell et al. 2004; Miki and Yoneda 2004). Des études *in vitro* ont démontré que l'exportine-5 avait la capacité d'interagir avec le dsRBD3 de Stau2 uniquement si celui-ci

avait la capacité de lier l'ARN. En effet, cette interaction est ARN dépendante (Macchi, Brownawell et al. 2004).

Il est intéressant de spéculer à l'effet que la liaison à l'ARNm permet un changement conformationnel de Stau2 lui permettant alors d'être exportée du noyau via l'exportine-5. De même, lorsque celle-ci se dissocie de son cargo et n'est plus liée à l'ARNm, elle acquière alors la capacité d'être relocalisée au noyau.

Pour ce qui est de Stau2⁵⁹, elle se retrouve accumulée au noyau uniquement si ses deux voies d'export sont inhibées. Par exemple, si on ajoute de la Leptomycine B, inhibant la voie de CRM1, et si à la fois on mute son domaine de liaison à l'ARN, en l'empêchant également d'être exportée via l'exportin-5 (Miki and Yoneda 2004).

Enfin, nous discuterons dans la section 4.4.1 de ZFR, un partenaire protéique de Stau2 jouant un rôle au niveau de son transit nucléaire. Nous verrons que la sous-expression de ZFR induit la relocalisation au noyau uniquement de l'isoforme Stau2⁶²-HA. En effet, ni la distribution de Stau2⁵⁹-HA ni celle de Stau1 ne sont affectées (Elvira, Massie et al. 2006). Nous discuterons également de l'association des complexes Tap/p62 et Y14/Mago, des facteurs d'export nucléaire, avec Stau2 dans la section 4.4.2.

Encore une fois, ces résultats suggèrent des rôles distincts entre les différents isoformes de Stau2. Identifier les ARNm spécifiquement associés à chacun d'eux permettrait de mieux discerner ceux-ci.

3.4. Structures d'ARNm liées par Staufen

3.4.1. Liaison de dStau à l'ARNm de bicoid

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, Stau s'associe à l'ARNm *bicoid* afin d'en permettre la localisation et l'ancrage au pôle antérieur de l'ovocyte de la drosophile. Il est connu que la région nécessaire à cette localisation se retrouve dans le 3'UTR de l'ARNm, sous forme d'une longue séquence d'environ 650 nucléotides (figure 15). Il est prédit par analyse informatique (MFOLD) que cette région forme une structure tertiaire complexe contenant trois tiges-boucles (Ferrandon, Elphick et al. 1994; Ferrandon, Koch et al. 1997). Trois régions furent ciblées pour l'étude, soit le nucléotide 148 de la tige III, le nucléotide 89 situé à la région distale de la tige IV et le nucléotide 88 de la région distale de la tige V (Ferrandon, Elphick et al. 1994).

L'importance de la structure double-brin au sein de ces tiges boucles fut démontrée par mutagenèse dirigée de ces nucléotides. Lorsque l'intégrité de l'une ou l'autre de ces trois tiges fut affectée, la localisation, normalement induite par Stau, s'en trouvait abolie. Une fois de plus, la séquence nucléotidique ne semble pas être responsable de la reconnaissance par Stau puisqu'une double mutation, restaurant l'intégrité de la tige mais modifiant cependant la séquence primaire de celle-ci, permet à nouveau la localisation du transcrit. Seule la double mutation présente dans la tige IVc a empêché la relocalisation du transcrit. Dans ce cas il est possible que la séquence primaire soit nécessaire, mais il semble plus probable que la structure prédite soit inexacte et que cette modification affecte la structure de la tige ou encore qu'un co-facteur nécessaire au rôle de Stau ne puisse plus reconnaître cette tige (Ferrandon, Elphick et al. 1994).

Afin d'ajouter à la complexité, une interaction intermoléculaire au niveau de la tige III est nécessaire afin que le signal soit reconnu par Stau (Ferrandon, Koch et al. 1997).

3.4.2. L'ARNm de Arf1 contient un élément de liaison à mStau1 appelé SBS (stau binding site)

La structure du SBS, Stau binding site, permettant la liaison du transcrit de *Arf1* par Stau, fut étudiée à l'aide d'une série de délétions et de mutations au sein d'un transcrit rapporteur, pSport-ARF1-SBS. L'immunoprécipitation de la protéine Stau et la reverse-transcription de l'ARNm mutant étudié ont permis d'identifier la présence ou l'absence de ces transcrits au sein du complexe ribonucléoprotéique de Stau1.

L'absence de produits de reverse-transcription indique l'absence de liaison de Stau au transcrit muté. Les résultats obtenus identifiaient les séquences nucléotidiques situées entre les nucléotides 30–79 et 200-249 du SBS comme étant nécessaires à la liaison de Stau1 au transcrit. Ce résultat suggérait qu'une tige boucle pouvait être formée entre certains nucléotides présents dans ces deux régions. Cette hypothèse fut d'avantage appuyée par la structure proposée par le programme RNAfold qui identifia une tige potentielle de 19 nucléotides entre les nucléotides 75-93 et 212-194 (figure 15). Les études de mutation et de double mutation compensatrice confirmèrent l'importance de l'intégrité de cette tige. Il fut également intéressant de constater que cette tige semble être conservée au sein de différentes espèces. En effet, cela suggère une importance évolutive à la présence de cette tige dans la région 3'UTR de l'ARNm de *Arf1* (Kim, Furic et al. 2007).

3.5. Divers rôles et fonctions de Stau au niveau de la traduction

Comme nous en avons fait état, l'association entre Stau et le ribosome fut observée lors de nombreuses expérimentations. Qu'il s'agisse de colocalisation ou de cosédimentation, Stau est retrouvée en complexe à la fois avec le réticulum endoplasmique rugueux, les polysomes, le ribosome intact et chacune de ses sous-unités (Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Luo, Duchaine et al. 2002). Cela tend à indiquer que Stau est impliquée de près ou de loin dans le mécanisme de la traduction.

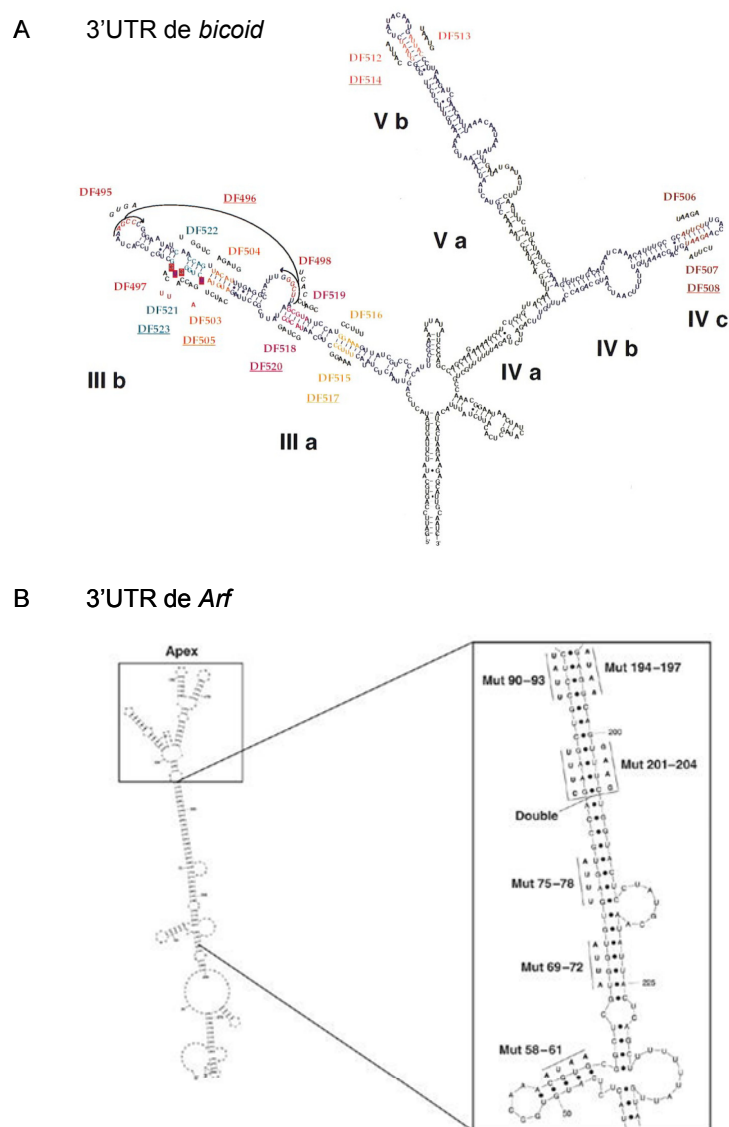


FIGURE 15 : Structures d'ARN liées par Stau

A) Structure suggérée par le programme MFOLD de la région 3'UTR (nucléotide 181-720) du transcrit *bicoid*. La région liée par Stau est indiquée en bleu. B) Structure secondaire suggérée par le programme Sfold v2.0 du Staufen binding site (SBS) située dans la région 3'UTR du transcrit *Arf1* avec agrandissement de la tige principale liée par Stau. Adapté de (Ferrandon, Koch et al. 1997) (Kim, Furic et al. 2007).

3.5.1. Rôle chez la drosophile

Chez la drosophile, Stau est importante pour la dé-répression de la traduction de l'ARNm *oskar* une fois localisée au pôle postérieur. Le dsRBD5 est le domaine responsable de la traduction d'*oskar* alors que sa localisation au pôle postérieur dépend du dsRBD2 (Ramos, Grunert et al. 2000).

3.5.2. Rôle dans les cellules de mammifère

Dans les cellules de mammifère, il fut démontré que Stau1 a la capacité de soulever l'inhibition de la traduction induite par l'ajout d'une structure en tige-boucle, TAR, dans la région 5' non traduite d'un ARNm rapporteur, TAR-CAT *in vitro* ou TAR luciférase *in vivo*. Cette structure est originalement retrouvée à l'extrémité 5' des transcrits du VIH-1. Celle-ci inhibe la traduction en empêchant les facteurs de traduction d'atteindre la structure de la coiffe. L'ajout de doses croissantes de Stau1 avec ces différents rapporteurs se traduit par une augmentation croissante de leur synthèse protéique. Cette augmentation s'accompagne d'un déplacement du transcrit rapporteur vers les fractions correspondant aux polysomes denses. C'est à dire une fraction très active en traduction.

Afin de médier son action, Stau1 se doit de lier la région 5'UTR de l'ARNm. En effet, Stau1 n'a pas de rôle sur la traduction générale des transcrits présents et, donc, seuls les transcrits possédant un domaine de liaison pour Stau1 en 5'UTR seront traduits.

La façon dont elle joue son rôle n'est pas encore connue. Plusieurs hypothèses ont été suggérées : de la déstabilisation de la structure en 5'UTR au recrutement des facteurs de traduction incluant la coiffe en passant par la stabilisation du transcrit dans le ribosome (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005; Falley, Schutt et al. 2009).

3.6. Rôle de Staufen dans la dégradation d'ARNm

Parmi les nombreux rôles réalisés par Stau, nous pouvons maintenant inclure celui d'inducteur de la dégradation d'ARNm. Voici dans un premier temps une brève description du NMD, « nonsense-mediated decay », un mécanisme de surveillance d'ARNm bien répertorié. Nous discuterons ensuite du SMD « Staufen mediated decay ». Ensuite, nous mettrons en parallèle ces deux mécanismes afin de mieux en comprendre leur interrelation.

3.6.1. Un survol du NMD

Le NMD permet la dégradation d'ARNm possédant un codon « stop » inséré prématurément au sein de sa séquence nucléotidique. Il permet à la cellule d'éviter de traduire cet ARNm aberrant et ainsi de synthétiser une protéine tronquée qui pourrait agir de façon néfaste dans la cellule, en agissant comme dominant négatif par exemple.

Pour être reconnu par le complexe de dégradation, il doit y avoir présence d'un codon stop en amont d'une jonction entre deux exons. Lors de l'épissage de l'ARNm, il y a déposition d'un complexe protéique appelé le complexe de jonction d'exon, EJC, à environ 20 à 24 nucléotides en amont de cette jonction. Ce complexe de jonction inclut les protéines du NMD Upf3/3x, Upf2 et Upf1 qui sont recrutées selon cette même séquence (Maquat 2004; Silva and Romao 2009).

Lors de la traduction, le ribosome termine la synthèse protéique au niveau du codon stop, ce qui occasionne une interaction entre les facteurs de terminaison de la traduction et les protéines de l'EJC situées en aval, dont la protéine Upf1. En temps normal, il n'y a pas d'EJC en aval du codon stop. Cette interaction n'est donc pas possible. Ce phénomène engendre ensuite la phosphorylation d'Upf1 via la kinase SMG-1. Puis s'ensuit une série de

phosphorylations qui mènera finalement au recrutement de la machinerie de dégradation (Maquat 2004; Silva and Romao 2009).

3.6.2. Le mécanisme du SMD

Contrairement au mécanisme du NMD, la dégradation induite par Stau, appelée « staufen mediated decay » ou SMD, n'est point dépendante d'un codon stop prématuré. Au contraire, le SMD agirait au niveau des ARNm cellulaires intacts afin d'en réguler leur concentration plasmatique. Pour ce faire, Stau doit se lier en aval du codon de terminaison, soit dans la séquence 3' non traduite de l'ARNm. Il médie son effet via son interaction avec le facteur Upf1, et ce, de façon indépendante des facteurs Upf2 et Upf3/3x, contrairement au NMD décrit plus tôt qui lui dépendait de ces deux facteurs (Kim, Furic et al. 2005).

Ce mécanisme fut étudié à l'aide d'un ligand endogène de la protéine Stau1, soit l'ARNm de l'ADP-ribosylation factor (Arf) 1. Il fut démontré que la diminution des niveaux cellulaires de la protéine Sau1, par siRNA, induisait la stabilité de cet ARNm. De plus, il fut établi que cette stabilité était dépendante de la séquence liée par Stau1 préalablement identifiée dans le 3'UTR de cet ARNm. Celle-ci est située entre les nucléotides 622 et 924 du 3'UTR, une région ainsi appelée « staufen binding site » ou SBS. De même, il fut démontré que l'ajout de cette séquence en 3'UTR d'un ARNm rapporteur induit la déstabilisation de cet ARNm, et ce, toujours de façon dépendante des niveaux cellulaires de Stau1 (Kim, Furic et al. 2005).

Cette découverte est des plus intéressantes. En effet, nous savons maintenant que les niveaux cellulaires de Stau1 influent la stabilité de nombreux ARNm. Que ce soit un changement local au niveau synaptique ou global lors du cycle cellulaire, il est permis de croire que Stau1 permet la régulation fine d'une population d'ARNm au cours de phénomènes cellulaires complexes (Kim, Furic et al. 2005).

3.6.3. La relation entre le NMD et le SMD en est une de compétition

Les résultats tendent à démontrer que ces deux phénomènes sont en compétition au niveau cellulaire vu leur dépendance au facteur Upf1. En effet, on trouve une compétition pour le site de liaison d'Upf1 entre les protéines Upf2 et Stau médiant, respectivement le NMD et le SMD (Gong, Kim et al. 2009).

Certains transcrits d'ARNm déstabilisés lorsque la concentration de Upf2 est réduite se retrouvent également dans la liste des cibles du SMD. Ceci suggère que le SMD est favorisé dans cette condition où le NMD est inhibé. Inversement, l'augmentation de la dégradation de certains transcrits d'ARNm lors d'un siRNA contre Stau1 inclut certaines cibles du NMD (Gong, Kim et al. 2009).

Ainsi, suite à la sous-expression de Stau1, la concentration de 1.1 % des transcrits présents dans les cellules HeLa se trouve augmentée alors que 1.0% s'en trouve diminuée. (Kim, Furic et al. 2007)

Il fut intéressant de constater que la modification de cet équilibre est responsable de la différenciation des myoblastes en myotubes. En effet, l'efficacité du SMD est favorisée au détriment du NMD lors de cette différenciation. Parmi les multiples cibles du SMD et du NMD possibles, l'une des hypothèses suggère l'implication des ARNm *PAX3*, cible du SMD et celui de la *myogenin*, cible du NMD. L'ARNm *PAX3*, codant une protéine responsable du maintien de la cellule sous forme de myotube, se trouve ciblé à la dégradation par le SMD alors que l'ARNm *myogenin*, codant une protéine requise pour la différenciation, se retrouve stabilisé par la régulation à la baisse du NMD (Kim, Furic et al. 2007; Gong, Kim et al. 2009).

3.7. Rôle de Staufen dans le transport et la régulation de divers ARNm non-neuronaux

Stau joue un rôle primordial au niveau du transport de l'ARNm. Dans cette section, nous discuterons de quelques exemples de l'implication de Stau dans la localisation et la régulation de certains transcrits au sein de différents modèles non-neuronaux. Nous réservons la localisation d'ARNm dendritiques pour la section 5.

3.7.1. dStau et le transport des ARNm bicoid et oskar, respectivement au pôle antérieur et postérieur de l'ovocyte de la drosophile

dStau est nécessaire à la bonne localisation des transcrits *bicoid* et *oskar* au sein de l'ovocyte. En effet, l'axe antéropostérieur de l'ovocyte se définit grâce à un gradient de protéines Bicoid (à partir du pôle antérieur) et Oskar (à partir du pôle postérieur). Ce gradient est possible grâce à la localisation respective de ces transcrits au pôle antérieur et postérieur (Roegiers and Jan 2000).

3.7.2. xStau est responsable du transport tardif des transcrits Vg1 et VgT au pôle végétal de l'ovocyte du Xenope

Lors du développement de l'ovocyte, l'ovogenèse, plusieurs ARNm sont transportés dans une région appelée cortex végétal. Ce transport se fait en deux étapes. Le transport initial, appelé METRO, débute au stade I de l'ovogenèse et se termine au stade II. Celui-ci est suivi du transport tardif, débutant au milieu de l'ovogenèse et se terminant au stade IV. Les ARNm sont ensuite maintenus en place jusqu'à la fin de l'ovogenèse, c'est-à-dire le stade VI.

xStau est principalement exprimée au stade III-IV de l'ovogenèse (Allison, Czaplinski et al. 2004; Yoon and Mowry 2004). Elle est présente dans tout le cytoplasme

jusqu'au stade III-IV où elle se trouve alors concentrée au cortex végétal de l'ovocyte. Ce mode de localisation, très similaire au transport tardif d'ARNm, a permis d'établir l'importance de xStau dans ce mécanisme. En effet, suite à l'immunoprécipitation de la protéine xStau, la présence des ARNm *Vg1* et *VegT* au sein du complexe, deux ARNm transportés lors du transport tardif, fut démontrée, contrairement aux ARNm *Xcat2* et *Xwnt11*, deux ARNm transportés lors du transport initial, et qui ne furent pas détectés (Yoon and Mowry 2004). De plus, un dominant négatif de xStau abolit la localisation d'un rapporteur de *Vg1* (Yoon and Mowry 2004). Fait intéressant : la présence du moteur moléculaire kinésine fut détectée dans le complexe de xStau.

3.7.3. Identification d'ARNm liés par hStau1 et importance de hStau1 dans la stabilité de ceux-ci

Une première étude parue en 2005 par le groupe de DesGroseillers et Maquat, entreprit l'identification des ARNm liés par hStau1. Ainsi une première puce d'Affimetry, U133A, contenant près de 22 000 gènes humains fut hybridée à l'aide des ARNm isolés à partir de l'immunoprécipitation de la protéine Stau1-HA₃ dans les cellules de HEK293. Ils identifièrent ainsi 23 ligands principaux de hStau1, dont l'ARNm de *Arf1* (Kim, Furic et al. 2005).

Une seconde étude suggère de façon indirecte une population de transcrits liés, ou du moins influencés par hStau1. Pour ce faire, les auteurs identifièrent les ARNm dont les niveaux cellulaires étaient modifiés dans un contexte de sous-expression de la protéine hStau1, mais cette fois dans les cellules HeLa. Trois purifications indépendantes d'ARNm furent hybridées sur les puces d'Affymetry de gènes humains, U133 Plus 2.0, comprenant 52 245 oligonucléotides correspondant à près de 29 555 gènes (Kim, Furic et al. 2007). L'expression de 124 transcrits d'ARNm se trouva augmentée dans cette condition, soit 1.1% du transcriptome. Alors que l'expression de 1.0% du transcriptome, soit 115 gènes, fut diminuée. Comme nous en avons fait état plus tôt, cela s'explique sûrement par

l'augmentation de l'effet du NMD. L'expression d'une vingtaine de ces gènes fut confirmée par RT-PCR (Kim, Furic et al. 2007).

Les ARNm surexprimés lors de la sous-expression de Stau1 et prévus être de bons ligands potentiels de celui-ci participent à de nombreuses voies métaboliques : de la transduction du signal, à la prolifération, l'adhésion et la motilité cellulaire en passant par le métabolisme de l'ARN (Kim, Furic et al. 2007).

Il fut intéressant de constater que certains des ARNm, tels *c-JUN*, *SERPINE1* et *IL7R*, dont la concentration est augmentée lors de la sous-expression de hStau1 l'était également lors de la sous-expression d'Upf1. Cette surexpression ne pouvait être expliquée par l'inhibition du NMD, puisqu'aucun de ces ARNm ne possède un codon stop situé en amont d'une jonction exon-exon. Les auteurs suggèrent donc que l'explication réside dans la voie du SMD. En effet, ils confirmèrent l'association de Stau1 avec les 3'UTR de ces trois gènes. De même, l'ajout de l'un ou l'autre de ces 3'UTR à un transcrit rapporteur suffit à éliciter la dégradation de celui-ci, et ce, dépendamment de la présence de Stau1, évidemment (Kim, Furic et al. 2007).

Cette étude a permis d'identifier comme ligand endogène de Stau1 les ARNm *de c-Jun*, *Serpine1*, *IL7R* et *Gap43*, tout en confinant le site de liaison à la région de 3'UTR de ces ARNm. De même, ils mirent en relief une population d'ARNm potentiellement liés par Stau1, soit 1.1% du transcriptome des cellules HeLa (Kim, Furic et al. 2007).

4. Les complexes ribonucléoprotéiques de Staufen

Nous avons déjà introduit le rôle de Stau au sein de plusieurs mRNP. En effet, nous avons discuté de la présence de Stau au sein des granules de stress, des P-bodies, du complexe RISC ou encore des polysomes. Dans cette section, nous caractériserons l'association de Stau avec certains facteurs protéiques précis et aborderons quelques études ayant permis de les identifier. Nous discuterons de l'importance de Stau au sein des granules et des particules de transport dans la prochaine section.

4.1. Importance des partenaires protéiques dans la fonction de dStau

4.1.1. *Hrp48*

Le transport de l'ARNm *oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte permet la formation de l'abdomen et des cellules germinales de la drosophile. dStau est l'un des déterminants du transport de cet ARNm. Il fut démontré que la protéine hrp48, une hnRNP abondante, était nécessaire à la localisation de Stau au pôle postérieur (Huynh, Munro et al. 2004). Il est donc important, afin de localiser correctement un ARNm, que Stau soit entourée d'un complexe protéique particulier. Mentionnons qu'hrp48 a la capacité de lier directement le 5' et le 3'UTR d'*oskar* (Gunkel, Yano et al. 1998).

4.1.2. *Y14*

Il semble que la localisation de la protéine dStau au pôle postérieur dépend de nombreux partenaires protéiques. En effet, la protéine Y14 est également impliquée dans ce transport. Il s'agit d'une protéine liant l'ARN faisant partie de l'EJC. Le mutant de la protéine Y14, *y14^{EP(2)0567}*, abolit la localisation postérieur de dStau de même que celle de

l'ARNm *oskar*. Celui-ci se retrouve distribué de façon homogène dans le cytoplasme de l'ovocyte, et ce, malgré un cytosquelette de microtubule intact. Il est important de souligner que le transport de l'ARNm *bicoid* ne s'en trouve point affecté. Il est intéressant d'émettre l'hypothèse que différentes populations de protéines composent différents complexes ribonucléoprotéiques avec Stau et permettent à un transcrit donné d'être localisé à un endroit précis et distinct (Hachet and Ephrussi 2001).

4.1.3. Barentsz

Barentsz est une autre protéine identifiée lors d'une étude de mutants abolissant la localisation postérieure de dStau au sein de l'ovocyte et, encore une fois, le transport de l'ARNm *oskar* s'en trouve affecté. Contrairement à Stau, Barentsz ne se retrouve pas ancrée au pôle postérieur et n'est donc pas requise lors des étapes subséquentes. Son rôle n'est que transitoire et montre bien l'importance d'une protéine donnée à un endroit et à un moment précis (van Eeden, Palacios et al. 2001). Stau jouerait son rôle principalement dans la stabilisation de l'interaction entre *oskar* et Barentsz plutôt que dans la localisation de ce complexe. En effet, la faible concentration de complexes Barentsz-*oskar* produits en l'absence de Stau se retrouve localisée normalement au pôle postérieur (van Eeden, Palacios et al. 2001).

4.1.4. Importance selon le stade de développement cellulaire

La formation des granules se modifie dans le temps, ce qui suggère qu'elle est dépendante de protéines exprimées à un moment bien précis. En effet, lorsque le 3'UTR d'*oskar* est injecté dans l'ovocyte, celui-ci est recruté dans les granules de dStau. Cependant, lorsqu'il est injecté dans l'embryon, il ne forme pas de granules avec dStau. Certains facteurs permettant l'association d'*oskar* avec dStau sont donc absents à ce moment. Ce résultat suppose qu'un cofacteur peut être nécessaire afin que Stau s'associe à certaines cibles d'ARNm, du moins au transcrit *oskar* (Roegiers and Jan 2000).

4.2. mRNP mStau1 : colocalisation avec divers partenaires protéiques

4.2.1. Pur- α

Stau est associée au réticulum endoplasmique, aux polyribosomes, aux microtubules et est présent dans le compartiment somatodendritique des neurones, tout comme la protéine Pur- α . Comme Stau, Pur- α est une protéine liant l'ARN et possédant de nombreuses fonctions, allant de la régulation de la transcription à la localisation dendritique d'ARNm. Au-delà de cette même distribution, il a été démontré, par immunofluorescence et immunoprécipitation, que ces deux protéines faisaient partie de mêmes complexes protéiques (Ohashi, Koike et al. 2002; Johnson, Kinoshita et al. 2006). De plus, cette association persiste en présence d'EDTA, c'est donc dire que celle-ci n'est pas médiée par la présence de polyribosomes (Ohashi, Koike et al. 2002). L'importance d'une telle association n'a pas encore été démontrée.

4.2.2. FMRP

À ce jour, de nombreuses études de colocalisation et de coimmunoprécipitation ont montré la présence de FMRP au sein des complexes de Stau, tant chez la drosophile que dans les neurones d'hippocampes en cultures (Ohashi, Koike et al. 2002; Barbee, Estes et al. 2006; Ferrari, Mercaldo et al. 2007). Cette association est indépendante de l'ARN (Villace, Marion et al. 2004). De plus, la présence d'un tel complexe dans les cellules HEK293 démontre une certaine similarité entre les mRNP cellulaires et neuronaux (Villace, Marion et al. 2004). Malgré l'importance de ces deux protéines dans la traduction et le transport dendritique d'ARNm, le rôle d'une telle association n'a pas encore été déterminé. Le rôle de FMRP fut abordé plus en détail dans la section 2.3.6.

4.2.3. Barentsz

Comme nous l'avons mentionné, dBarentsz est une protéine co-localisant avec dStau et, tout comme celle-ci, elle est nécessaire à la bonne localisation de l'ARNm *oskar* dans l'ovocyte de la drosophile (van Eeden, Palacios et al. 2001).

Il fut donc de mise d'étudier si une telle association pouvait également se retrouver entre ces homologues chez d'autres espèces, ce qui représenterait un mécanisme de transport conservé au fil de l'évolution. Comme de fait, il fut démontré que mStau1 et mBarentsz font partie des mêmes complexes au sein des neurones d'hippocampes. Elles sont localisées principalement dans la région du réticulum endoplasmique périnucléaire, mais sont également présentes dans la région dendritique. Cette colocalisation est inversement proportionnelle à la distance dendritique parcourue. Il est intéressant de constater que cette association est médiée par la région homologue entre dBtz et mBtz et qui se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cependant, il ne s'agit pas d'une interaction directe, mais bien dépendante de l'ARN (Macchi, Kroening et al. 2003).

4.2.4. Phosphatase-1

Stau1 coimmunoprécipite et colocalise avec les trois isoformes de la protéine phosphatase-1, PP1 α , PP1 β et PP1 γ (Monshausen, Rehbein et al. 2002; Brendel, Rehbein et al. 2004). Elle interagit directement avec la phosphatase via le motif RKVTF situé entre son dsRBD4 et dsRBD5, motif présent chez de nombreux substrats de la phosphatase. Cette interaction ne semble pas affecter l'activité intrinsèque de la phosphatase-1 (Monshausen, Rehbein et al. 2002). Plusieurs hypothèses sont mises de l'avant afin d'expliquer l'importance d'une telle interaction. Par exemple, la phosphorylation de Stau, ou encore d'une autre protéine du complexe permettrait de moduler la structure du mRNP, sa localisation ou encore la traduction des ARNm présents.

4.2.5. Études par protéomiques des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1

Deux équipes ont entrepris d'identifier les facteurs protéiques présents au sein des complexes de Stau1 à l'aide d'études par spectrométrie de masse.

4.2.5.1. Caractérisation des complexes de Staufen1-TAP à partir des cellules HEK293T

Une première équipe a entrepris d'identifier les partenaires protéiques de Stau1 par protéomique en utilisant comme approche la purification d'affinité du complexe associé à Staufen1-TAP, exprimée dans les cellules HEK293T (Villace, Marion et al. 2004).

Ils identifiaient ainsi des protéines ribosomiques (P0, S4, S6, L6, L28), des éléments du cytosquelette (β -5-tubulin, α -internexine), des moteurs protéiques (chaîne lourde de myosine), la nucléoline, l'hélicase A, des facteurs de traduction et de régulation (PABP1, hnRNP, p-associated protein kinaseII, Ras GAP, IQGAP1) de même que hStau2.

Ils confirmèrent la présence des protéines S6, Nucléoline, PABP1, Hélicase A et β -tubuline, par coimmunoprécipitation, suivie de l'immunobuvardage de type western. De plus, ils identifiaient par immunobuvardage de type western la présence de d'autres protéines dans ce complexe, protéines non retrouvées dans l'étude de protéomique, mais ayant un grand potentiel d'association avec Stau1, soit les protéines de β -actin, α -tubulin, kinésine, dynéine, FMRP, Tau, Rac1 et cdc42. Dans chacun des cas, les protéines ne furent point retrouvées dans l'IP contrôle. De même, les protéines p115 et Calnexin, abondamment présentes dans le cytoplasme, ne figurèrent pas dans les IP.

Afin de s'assurer que l'interaction n'était pas médiée par l'ARN, ils effectuèrent à nouveau les études de coimmunoprécipitation, mais cette fois en traitant le lysat cellulaire à la RNase A. L'interaction de nombreuses protéines dont PABP1, Nucléoline et certaines

protéines ribosomiques fut ainsi abolie. Ces résultats sont en accord avec la seconde étude protéomique que nous aborderons plus tard. Cependant, il fut intéressant d'observer que l'interaction entre Stau1 et l'actine, la tubuline, tau, la dynéine et FMRP était toujours présente (Villace, Marion et al. 2004).

Transposition de l'étude dans un contexte neuronal

Une tentative en vue d'identifier certains partenaires protéiques neuronaux de Stau1 fut entreprise dans des neuroblastes humains, les SHSY5Y, différenciés à l'aide de l'acide rétinoïque (Villace, Marion et al. 2004).

La colocalisation de Stau1 et des protéines préalablement identifiées, soit S6, L28, dynein, kinesine, IQGAP1, cdc42, rac1, nucléoline, hélicase A, PABP1 et FMRP fut confirmée. De plus, la colocalisation de Stau1 avec les microtubules, les neurofilaments et l'actin fut établie à l'aide de la tubuline et de tau, de l'interneuxine et de la phalloïdine, respectivement (Villace, Marion et al. 2004).

4.2.5.2. Caractérisation des complexes de Staufen1-PDZ à partir des cellules HEK293

Une seconde équipe identifia par protéomique les protéines isolées suite à la purification des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1. Purification effectuée à l'aide d'un protocole d'affinité dans lequel le domaine PDZ est reconnu par un peptide de 10 acides aminés liés aux billes de sépharose. Les complexes traités ou non à la RNase furent isolés à partir de cellules HEK293 exprimant la protéine de fusion Stau1-PDZ. Les protéines ainsi isolées furent identifiées par spectrométrie de masse. Les complexes de hnRNPk et de Sharpin furent également isolés pour fin de comparaison (Brendel, Rehbein et al. 2004).

L'interaction entre Stau1 et les protéines nucléoline, NFAR, β 4-tubuline, kinesine1, certaines protéines ribosomiques, tant de la petite que de la grande sous-unité (L21, L10, L15, L14, S8, L7a, S3a, S6, S2, L6 et P0), hnRNPU et l'hélicase A (RHA) fut résistante au traitement à la RNase. Cependant, le traitement à la RNase diminua grandement la quantité de nucléoline associée à Stau1, comme ce fut le cas dans l'étude précédente. La très grande majorité de ces protéines ne furent point retrouvées dans les complexes de hnRNPK et de Sharpin, à l'exception de hnRNPU. Ce résultat suggère que Stau1 fait partie d'un complexe ribonucléoprotéique distinct (Brendel, Rehbein et al. 2004).

Les auteurs identifièrent également par immunobuvardage western d'autres protéines susceptibles de se retrouver en complexe avec Stau1, soit la kinesin, PABP, FMRP, la dynéine, α -tubulin et la phosphatase-1 (PP1). Encore une fois, la RNase abolit l'association entre Stau1 et PABP. Ce fut également le cas pour la dynéine, contrairement à la kinésine dont une fraction résista au traitement. Enfin, comme nous en avons déjà discuté l'association avec PP1 α est ARN-indépendante.

Ils poussèrent l'analyse de l'association entre Stau1 et les protéines nucléoline, PP1 et P0 plus loin. Ils établirent dans un premier temps que les domaines de liaison à l'ARN de Stau1 et de nucléoline étaient nécessaires à leur interaction et que le domaine de liaison de Stau1 à PP1 se trouvait entre le dsRBD4 et le dsRBD5. Finalement, ils démontrèrent que le domaine de liaison de Stau1 à P0 et PABP semblait nécessiter le dsRBD4 (Brendel, Rehbein et al. 2004).

4.3. mRNP de Stau2: colocalisation avec divers partenaires protéiques

4.3.1. ZFR

ZFR fut identifiée comme partenaire protéique de Stau2 lors d'une étude de double-hybride utilisant comme appât la portion N-terminale de la protéine. En effet, chez la drosophile, le domaine responsable du transport de dStau se situe dans le dsRBD2. Ainsi, dans un effort d'identification des partenaires protéiques responsables de la localisation de Stau2, les auteurs utilisèrent les dsRBD1 et dsRBD2 de Stau2⁶² comme appât. Du même coup, ils évitèrent de repêcher les facteurs dont l'association est médiées par l'ARN. Cela aurait en effet été possible via les autres dsRBD de la protéine.

ZFR est une protéine majoritairement nucléaire possédant trois domaines en doigt de Zinc C2H2. Cependant, une fraction de la protéine est cytoplasmique et colocalise dans une proportion d'environ 30% avec Stau2 au niveau du corps cellulaire et des dendrites. Le domaine de liaison à Stau2 se situe entre la fin du deuxième doigt de zinc et la fin du troisième. Cette association est ARN indépendante (Elvira, Massie et al. 2006).

Comme nous l'avons mentionné, sur gradient de saccharose Stau2⁶² est retrouvée dans les fractions légères sans ribosome, contrairement à Stau2⁵⁹ et Stau2⁵², qui elles, sont présentes dans les fractions ribosomales plus denses (Duchaine *et al.* 2002). Sur un gradient 20-60% ZFR cofractionne à la fois dans les complexes légers et plus lourds de Stau2⁶², Stau2⁵⁹ et Stau2⁵² (Elvira, Massie et al. 2006).

Malgré le cofractionnement de ZFR avec les trois isoformes de Stau2, seul Stau2⁶²-HA a la capacité d'immunoprécipiter ZFR. En effet, ni l'isoforme Stau2⁵⁹-HA ni Stau1 endogène ou Stau1⁵⁵-HA n'ont la capacité de coimmunoprécipiter ZFR. Cela confirme l'idée que ZFR soit associée à Stau2 via sa portion N-terminale, portion non retrouvée chez Stau2⁵⁹ ou Stau1 (Elvira, Massie et al. 2006).

De façon intéressante, la sous-expression de ZFR dans les neurones induit spécifiquement la relocalisation au noyau de l'isoforme Stau2⁶²-HA et non de Stau2⁵⁹-HA ou encore de Stau1 (Elvira, Massie et al. 2006).

Ces résultats suggèrent que ZFR fasse partie d'une sous-classe de complexes de Stau2 et soit responsable de la distribution spécifique de l'isoforme Stau2⁶². Il s'agit là d'un autre indice voulant que les divers isoformes de Stau possèdent certains rôles distincts.

4.3.2. Y14/Mago/p62/Tap

Une deuxième étude de double-hybrides fut effectuée afin d'identifier les partenaires protéiques de Stau2 (Monshausen, Gehring et al. 2004). Les auteurs utilisèrent comme appât l'isoforme Stau2⁵², qui ne contient qu'une petite partie de la portion N-terminale présente dans la première étude. Ils identifièrent ainsi la portion C-terminale d'une protéine très similaire à la nucléoporine p62, une protéine du pore nucléaire à domaine FG, qu'ils nommèrent simp62. Ils confirmèrent l'interaction des protéines de fusion myc-simp62Cterm et eGFP-Stau2⁵², de même que l'association de eGFP-Stau2⁵² et myc-p62Cterm par coimmunoprécipitation à partir des cellules HEK293T. Enfin, ils confirmèrent l'association entre Stau2 et p62 endogène par coimmunoprécipitation à partir de cerveaux d'embryon de rat. Comme l'expression cellulaire de Stau2 se rapproche davantage de p62 que de simp62, et que la portion C-terminale de ces deux protéines est très semblable, ils poursuivirent leur étude avec la protéine p62 plutôt que simp62.

L'interaction entre ces deux protéines fut pratiquement abolie par l'ajout de RNase ainsi que par l'inhibition de la transcription. De plus, l'export nucléaire de Stau2 est diminué suite à l'inhibition de la transcription. Cela suggère, encore une fois, que Stau2 doit se lier à l'ARN avant de pouvoir être exportée du noyau, possiblement à l'aide de p62 (Monshausen, Gehring et al. 2004).

Tap est une protéine responsable de l'export de nombreuses protéines et interagit au sein du pore nucléaire avec la protéine p62. Il fut donc indiqué de vérifier si Stau2 se retrouvait également en complexe avec celle-ci. Comme prévu, Tap se retrouve également dans l'immunoprécipitat de Stau2. Cependant, cette fois, l'interaction n'est pas perdue lors de l'ajout de la RNase (Monshausen, Gehring et al. 2004).

Finalement, Y14 et Mago sont des protéines du complexe de l'EJC et sont impliquées dans le transport au pôle postérieur du transcrit d'*oskar* chez la drosophile. Afin de vérifier si une telle association était également présente au sein des cellules neuronales, les auteurs entreprirent des études de coimmunoprécipitation à partir de cerveaux de rat. Comme de fait, Stau2 et le dimère Y14-Mago sont retrouvés au sein des mêmes complexes et cette association est ARN-indépendante (Monshausen, Gehring et al. 2004).

Malgré la localisation majoritairement nucléaire de Tap, p62, Y14 et Mago, une certaine colocalisation put être observée dans le corps cellulaire ainsi qu'aux dendrites. Dans le noyau, Stau2 est toujours présente sous forme granulaire et est majoritairement située à la périphérie du noyau où elle colocalise avec p62 au niveau de l'enveloppe nucléaire et avec Tap, Y14 et Mago au niveau de la membrane nucléaire (Monshausen, Gehring et al. 2004).

Tap, p62, Y14 et Mago sont autant de protéines pouvant jouer un rôle dans la composition du complexe de Stau2. Il aurait été intéressant de vérifier si ces interactions étaient spécifiques à un isoforme de la protéine et de définir le rôle de ces protéines nucléaires dans le transport dendritique de Stau2.

5. Rôle de Staufen dans la localisation dendritique d'ARNm

Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement aux complexes ribonucléoprotéiques neuronaux de Stau1 et Stau2. Cette section aborde plus en profondeur les différents types de complexe de transport contenant Stau1 et Stau2, les divers concepts et études appuyant l'importance de ces protéines dans le mécanisme de la localisation dendritique d'ARNm, ainsi que le rôle physiologique d'un tel transport.

5.1. Stau1 et Stau2 font partie des granules et des particules de transport d'ARNm

Le concept de granule et de particule, qui sert à qualifier les deux grandes classes de complexes de Stau, remonte à aussi loin qu'aux observations effectuées au cours de l'étude de Köhrmann (Kohrmann, Luo et al. 1999). Celle-ci met de l'avant la première visualisation en neurones vivants du mouvement d'une composante principale d'un mRNP, soit Stau1. Les auteurs réalisèrent que hStau1-GFP était présente au sein d'au moins deux populations de complexes. L'une de petite taille, localisée principalement à la périphérie du corps cellulaire et dans les dendrites, et l'autre de plus grande taille, principalement située au corps cellulaire, en péri-nucléaire (Kohrmann, Luo et al. 1999).

Une deuxième distinction fut établie grâce à l'observation de l'association de hStau1-GFP avec l'ARN marqué au syto14. Ce marquage est de l'ordre de 65.6% de façon générale. Cependant, il diffère selon le type de complexe observé. En effet, il est intéressant de constater que les complexes de grandes tailles colocalisent beaucoup moins avec l'ARN que les petits complexes dendritiques (Kohrmann, Luo et al. 1999).

Aussi, les complexes de grande taille sont plutôt immobiles alors que les plus petits se déplacent sur de grandes distances, principalement de façon antérograde (Kohrmann, Luo et al. 1999). Il fut suggéré que les gros complexes représentent des formes immatures de granules, n'ayant pas encore lié leur ARN, ce qui expliquerait leur immobilité. Les seconds, eux, découleraient des premiers et représenteraient alors des mRNP prêts à être localisés.

En résumé, les granules sont de gros complexes associés aux ribosomes et au réticulum endoplasmique, souvent désignés comme étant de larges complexes immobiles et les particules, des complexes plus fins non associés aux membranes que l'on associe souvent au mRNP de transport.

La majorité de Stau1 et de Stau2 se retrouve dans les complexes plus lourds qui sédimentent majoritairement dans le P100, à l'exception de Stau1⁶³ (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). Lorsque l'on sépare à nouveau la population de protéines solubles retrouvées dans le S100, dont Stau, nous pouvons identifier différentes populations de complexes. Celles-ci se distinguent de par leurs tailles, la présence ou non de ribosome, de marqueur du réticulum endoplasmique et également par leur sensibilité à la RNase. Nous retrouvons donc quelques granules, dans les complexes de plus grande taille. Puis, nous retrouvons les particules, des complexes de plus petite taille qui ne cosédimentent pas avec les ribosomes ou le RE. Les particules de Stau1, contrairement aux granules, sont sensibles à la RNase (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003).

Il existe, dans le cas de Stau1, de gros granules de 2 MDa, des particules de 670 kDa de même que la présence de dimères et de monomères de la protéine. Alors que pour Stau2 il s'agit d'une population de granules légèrement plus petites que 2 MDa et des particules de 440 KDa. Cependant, soulignons que pour les particules de Stau2, la sensibilité des complexes à la RNase ne fut pas étudiée. Cette migration différentielle entre Stau1 et Stau2 est l'un des nombreux résultats suggérant que ces protéines fassent partie de

différents complexes ribonucléoprotéiques. L'observation que Stau1 et Stau2 colocalisent très peu au niveau dendritique en est un autre exemple (Duchaine, Hemraj et al. 2002).

La présence de kinesin comigrant fortement avec les particules de Stau1, ainsi qu'avec celles de Stau2, fut une première indication que ce moteur moléculaire pouvait être responsable du transport de Stau le long des dendrites (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003).

5.2. Staufen se déplace le long des dendrites sur le réseau de microtubules et est responsable de la localisation d'ARNm

Plusieurs études ont démontré la colocalisation de Stau1 et Stau2 avec l'ARN au niveau dendritique, que ce soit par le marquage au Syto14, au bromure d'éthidium, par hybridation de la queue poly(A), ou encore indirectement par cofractionnement (Kohrmann, Luo et al. 1999; Tang, Meulemans et al. 2001). Depuis ce temps, ou en parallèle, des études plus poussées sur le mécanisme de transport de l'ARNm par ces protéines furent entreprises.

L'étude de Köhrman présente pour la première fois la visualisation du mouvement des complexes de Stau1 (Kohrmann, Luo et al. 1999). Des mouvements saltatoires et continus furent observés, et ce, tant dans les directions antérogrades que rétrogrades. Le mouvement antérograde est principalement saltatoire, c'est-à-dire que les complexes prennent une pose avant de poursuivre leur chemin. Il est cependant possible que certains complexes se dirigent ensuite dans la direction opposée ou présentent un mouvement oscillatoire Brownien (Kohrmann, Luo et al. 1999).

La vitesse moyenne de ces particules est de $6.4 \pm 3.2 \mu\text{m}/\text{min}$ avec une vitesse maximale de $24.3 \mu\text{m}/\text{min}$. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus pour la vitesse de déplacement de l'ARNm de MBP, soit d'environ 6–12 $\mu\text{m}/\text{min}$ dans

l'oligodendrocyte, avec celui de l'ARN de BC1 soit de 4.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ et de la vitesse de transport du transcrit de Arc soit de 5.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ au niveau dendritique. Il contraste cependant avec la vitesse du transport axonal allant jusqu'à 278 $\mu\text{m}/\text{min}$ et celui du transport dendritique vésiculaire qui est de 120 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Kohrmann, Luo et al. 1999).

Ce transport dépend d'un réseau de microtubules intacts. Non seulement les complexes ne sont-ils plus localisés, mais l'on observe également une diminution flagrante de la formation de complexes lorsque celui-ci est déstabilisé. Le réseau de microtubules est donc non seulement nécessaire à la localisation du complexe dans les dendrites, mais également au recrutement de Stau1 au sein de ces mRNPs (Kohrmann, Luo et al. 1999). Au contraire, la dépolymérisation de l'actine n'a aucune répercussion sur la localisation des complexes de Stau1 (Kohrmann, Luo et al. 1999). Il en va de même pour Stau2, qui dépend d'un réseau de microtubules intacts et dont la localisation est indépendante de l'actine (Tang, Meulemans et al. 2001).

5.2.1. Rôle de Stau1 dans le transport général de l'ARNm

Deux équipes démontrèrent l'importance de Stau1 dans le transport dendritique à l'aide de l'expression d'un dominant négatif de la protéine. Dans la première étude, l'utilisation d'un dominant négatif de Stau1 montra l'importance de celle-ci dans la localisation dendritique de mRNP contenant la grande sous-unité ribosomique. En effet, l'expression neuronale d'un mutant n'ayant plus le domaine TBD de Stau1 diminue la localisation dendritique d'un marqueur de l'ARN ribosomique 5.8S, une composante de la grande sous-unité. À l'inverse, la surexpression de la protéine-wt augmente la concentration de ce marqueur au niveau dendritique (Kim and Kim 2006).

Il est intéressant de mentionner que la dépolarisation dendritique induite par l'ajout de KCl augmente le nombre de complexes ribonucléoprotéiques positif pour Stau1 au niveau dendritique (Kim and Kim 2006). Et comme cette localisation est indépendante de la

synthèse protéique, cela suggère qu'une telle activité augmente le transport dendritique de Stau1.

Dans la deuxième étude, une souris mutante exprimant Δ Stau1, une version de la protéine sans le dsRBD3, principal domaine de liaison à l'ARN, fut créée (Vessey, Macchi et al. 2008). En plus d'abolir l'expression de Stau1-wt, les niveaux de cette protéine mutée sont très faibles. C'est donc dire qu'il existe très peu de Stau1 dans ces neurones.

Il fut intéressant d'observer le résultat de diverses combinaisons possibles de Δ Stau1 et de Stau-wt afin d'étudier l'importance de la composition des mRNP de Stau1 sur le transport du complexe. Ainsi, lorsque Stau1wt-YFP était exprimée dans les neurones Δ Stau1, 68% de celles-ci formaient des granules contre 83% lorsqu'elle était exprimée dans des neurones sauvages. La distance parcourue de ces granules était cependant conservée. Toutefois, lorsque Δ Stau1-YFP était transfectée dans les neurones exprimant Δ Stau1, alors seulement 18% des neurones formaient des granules et la distance parcourue le long des dendrites se trouvait dramatiquement diminuée (Vessey, Macchi et al. 2008).

Ces résultats suggèrent qu'il est primordial d'avoir plusieurs isoformes de la protéine intactes afin de permettre la bonne localisation du complexe et, par le fait même, des ARNm qui lui sont associés (Vessey, Macchi et al. 2008). En effet, le transport de l'ARNm β -actin fut légèrement diminué, de même que celui de l'ARNm poly-adénylé.

En accord avec ces résultats sont ceux de l'équipe de Martel et al. démontrant que Stau1 a la capacité d'interagir avec elle-même afin de former des complexes ribonucléoprotéiques fonctionnels (Martel, Dugre-Brisson et al. 2010).

5.2.2. Rôle de Stau2 dans le transport général de l'ARNm

L'expression d'un dominant négatif de Stau2 au niveau neuronal démontra l'importance de celle-ci dans le transport dendritique de l'ARN. Ce mutant ne possède plus

la portion C-terminale de la protéine qui comprend le TBD, mais contient toujours les dsRBD1-4 (Tang, Meulemans et al. 2001). Il se distribue uniquement au niveau du corps et des dendrites proximales. Il a donc perdu la capacité d'être localisé au niveau des dendrites distales. Il influence la distribution des ARNm au niveau cellulaire. En effet, la présence de ce mutant diminue la quantité d'ARN présents dans les mRNP au niveau dendritique. De plus, il augmente les concentrations d'ARNm au niveau somatique, ce qui suggère qu'il titre l'ARNm et prévient sa localisation dendritique normale par Stau2-wt. Au contraire, la surexpression de Stau2-wt augmente les concentrations dendritiques d'ARN et diminue les concentrations somatiques. Enfin, la distribution de l'ARN correspond à celle de différents mutants de Stau. Ce qui indique que Stau2 aurait un rôle déterminant dans la distribution d'ARNm au niveau dendritique (Tang, Meulemans et al. 2001).

5.3. Rôle de Stau dans la localisation d'ARNm neuronaux chez divers organismes

5.3.1. Transport de l'ARNm prospero dans le neuroblaste

Le transport d'ARNm dépendant de dStau est également nécessaire au cours du développement du système nerveux de la drosophile. Celui-ci est nécessaire au transport de l'ARNm *prospero* dans le neuroblaste lors de la division asymétrique formant le neuroblaste et la GMC, ganglion mother cell (Broadus, Fuerstenberg et al. 1998).

5.3.2. Transport d'ARNm nécessaire à la LTM chez la drosophile

Le rôle de dStau au niveau de la mémoire et de l'apprentissage fut mis à jour au cours d'une étude chez la drosophile. La mise en place d'un protocole de mémoire à long terme induit l'expression de nouveaux transcrits, dont celui de dStau (Dubnau, Chiang et al.

2003). Ils confirmèrent l'importance de dStau dans la LTM en produisant une mouche mutante, dont la capacité d'apprentissage fut abolie.

De plus, nous avons également établi l'importance de dStau dans la LTM lorsque nous avons discuté de l'importance de la répression du complexe RISC dans la mise en œuvre de la LTM dans la section 2.2.7.3.

5.3.3. Transport de l'ARNm Syntaxine chez l'Aplysie

L'aplysie est un organisme modèle très utilisé en neurosciences. Plusieurs modèles synaptiques furent établis grâce à l'accessibilité de ces circuits neuronaux.

La facilitation à long terme induite par la sérotonine, dans un neurone sensoriel, provoque la redistribution de l'ARNm de la *syntaxine* du pôle opposé de l'axone jusqu'à la partie initiale de celui-ci. L'importance de aStau dans ce mécanisme se trouve principalement au niveau du maintien du transcrite de la *syntaxine* au pôle opposé de l'axone lorsque le neurone est non stimulé. Elle joue cependant un rôle mineur dans le transport du transcrite à la partie initiale de l'axone suite à la stimulation par la sérotonine. L'isolement de aStau, par coimmunoprécipitation, a permis de montrer la présence de l'ARNm *syntaxine* au sein du complexe.

La bonne localisation de ce transcrite se fait conjointement avec la protéine CPEB, qui médie son effet via la région CPE présente dans le 3'UTR de l'ARNm. L'injection exogène du 3'UTR de la *syntaxine* a pour effet d'abolir à la fois la localisation du transcrite en situation non stimulée et l'accumulation du transcrite à la base de l'axone lorsque stimulé. L'injection seule de la région CPE ne modifie pas la localisation initiale du transcrite lorsque le neurone n'est pas stimulé. Cependant, la redistribution dépendante de la sérotonine est inhibée. Par contre, l'injection du 3'UTR, excluant la région CPE, empêche la ségrégation du transcrite au pôle opposé et diminue de 25% la redistribution de l'ARNm une fois le neurone activé. Il semble donc qu'une structure d'ARN présente dans le 3'UTR, excluant le

CPE, permette l'action de aStau sur la localisation du transcrit. L'absence de la protéine CPEB et aStau suite à l'ajout d'oligonucléotides antisens eut le même effet sur la localisation du transcrit que l'ajout exogène du CPE et du 3'UTR sans le CPE, respectivement (Liu, Hu et al. 2006).

5.4. Rôle de Stau dans le transport dendritique d'ARNm chez les mammifères

Nous avons discuté de l'importance de Stau1 et Stau2 dans le transport général de l'ARNm au niveau dendritique dans les sections 5.1 et 5.2. Puis, nous avons discuté de l'implication de Stau dans la localisation neuronale d'ARNm spécifique chez de nombreuses espèces dans la section 5.3. Dans cette section, nous aborderons le rôle de ces protéines dans la localisation dendritique de certains ARNm dans les cellules de mammifère.

5.4.1. Stau1 et le transport dendritique d'ARNm

5.4.1.1. Possible rôle de Stau1 dans le transport du transcrit de Map2

L'un des ARNm localisés les plus étudiés est celui de *Map2*. Une région de 640 nucléotides située dans son 3'UTR, appelé DTE (dendritic targeting element), fut identifiée comme étant nécessaire à sa localisation dendritique (Monshausen, Putz et al. 2001). La technique de triple-hybride fut utilisée afin d'identifier les protéines pouvant s'y lier, et donc, susceptibles de jouer un rôle dans le transport de cet ARNm. C'est ainsi que la région C-terminale de Stau1 fut identifiée.

L'utilisation des protéines purifiées et des ARN radiomarqués a également montré la capacité de Stau1 à lier la région nécessaire à la localisation de *Vgl* (VLE), et l'ARNm

tubulinea (Monshausen, Putz et al. 2001). Toutefois, il faut garder en tête qu'*in vitro* Stau1 n'a aucune spécificité de liaison.

Ces études de triple-hybride démontrèrent également la liaison de Stau1 à de nombreux autres éléments, tels une autre région du 3'UTR de *Map2*, le 3'UTR de *CamkII α* , celui de *tubuline- α* , *GAP*, ainsi que le VLE de l'ARNm *Vg1*. Aussi intéressants puissent sembler ces résultats, la spécificité de cette technique est à questionner.

5.4.1.2. Cosédimentation de Staufen1 avec plusieurs ARNm localisés

De façon indirecte, par cosédimentation, la présence de certains ARNm au sein des complexes de Stau1 put être suggérée. Pour ce faire, les ARNm présents dans chacune des fractions d'un gradient de saccharose, ayant permis de séparer selon leur taille les granules et les particules de Stau1, furent isolés (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003).

Une RT-PCR contre certains transcrits fut effectuée à partir de ces ARN. La présence des ARN *BC1*, *β -actin* et de *CaMKII α* , tous des transcrits localisés au sein des dendrites, fut identifiée dans la fraction des particules Stau1. Alors que les ARNm non localisés, tels *GAPDH*, *histone H3* et *CaMKII β* n'y figurèrent pas. Cependant, l'ARNm *Map2*, connu pour être localisé et identifié en triple-hybrides, ne fut point identifié. Ces résultats tendent à démontrer que Stau1 est responsable du transport d'une population précise d'ARNm et n'est donc pas associée à tous les ARNm localisés (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). Cependant, comme nous venons de le mentionner, ce résultat semble être en contradiction avec l'étude précédente qui suggérait un rôle de Stau1 dans le transport du transcrit *Map2*.

Suite à ces résultats, une première étude de colocalisation fut entreprise entre Stau1-HA et les transcrits *BC1* et *CaMKII α* à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*. Stau1 se trouva en effet dans les mêmes complexes que ces deux transcrits, contrairement aux ARNm *GAPDH* et *CaMKII β* , qui firent office de contrôles négatifs.

Cette étude suggère ainsi que Stau1 joue un rôle dans la localisation des transcrits *BC1*, *CaMKII α* et de *β -actin*. (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003)

5.4.1.3. Rôle de Stau1 dans le transport du transcrit de *CaMKII α*

Il semble bien que Stau1 ait un rôle dans le transport de l'ARNm de la *CaMKII α* . En effet, la localisation dendritique d'un transcrit rapporteur de la *CaMKII α* fut abolie suite à la sous-expression de Stau1 par siRNA. Il en fut de même lors de la sous-expression de Pur α , hnRNP-U et de PSF (Kanai, Dohmae et al. 2004). Cependant, les siRNA contre DDX3 et SYNCRIP n'eurent aucune répercussion sur la distribution de cet ARNm (Kanai, Dohmae et al. 2004).

5.4.2. *Stau2* et le transport dendritique d'ARNm

5.4.2.1. Rôle dans le transport de l'ARNm de β -actine

Dans les neurones où le niveau de Stau2 est significativement réduit, le cytosquelette d'actine se retrouve sous une forme très désorganisée. Le problème ne semble pas résider au niveau de la quantité de protéines produites, mais plutôt dans son organisation structurale au sein du neurone. En effet, la quantité totale d'actine ne semble pas modifiée.

Malgré ce résultat, une baisse d'environ 23% de la quantité d'ARNm *β -actin* dans le corps cellulaire, de même qu'une réduction de 37% dans le compartiment dendritique, furent démontrées. Il fut intéressant d'observer que cette modification n'était pas généralisée puisque la distribution des ARNm *GAPDH* et *CaMKII α* ne fut point modifiée. (Goetze, Tuebing et al. 2006) En effet, il est intéressant de constater qu'à l'inverse de Stau1, le siRNA contre Stau2 n'affecte pas la distribution dendritique du transcrit *CaMKII α* .

5.5. Rôle physiologique de Stau dans les neurones de l'hippocampe

Dans cette section, nous discuterons de l'importance d'un tel mécanisme au niveau de la morphologie et de la physiologie neuronale.

5.5.1. Importance neurophysiologique de Stau1

5.5.1.1. Rôle de Stau1 dans la morphologie neuronale

La complexité de l'arbre dendritique des neurones obtenus à partir de souris modifiée génétiquement avec le mutant de Stau1, Δ Stau1 (voir section 5.2.1), se trouve diminuée. En effet, malgré l'arborisation primaire qui reste constante, il se trouve que la quantité de divisions primaires et secondaires est diminuée (Vessey, Macchi et al. 2008).

Aussi, la densité synaptique des neurones Δ Stau1 est significativement moindre. De plus, il existe d'avantage d'épines de forme filopodale. Cependant, malgré le nombre d'épines réduit, chacune d'elle est associée à un élément présynaptique, ce qui indique une certaine fonctionnalité de la synapse malgré le changement de morphologie (Vessey, Macchi et al. 2008).

5.5.1.2. Rôle de Stau1 dans le phénomène d'apprentissage

Contrairement à ce que l'on aurait pu penser, la faculté d'apprentissage de ces souris, étudiée à l'aide des tests du bassin de Morris et d'un protocole de peur conditionné, ne démontra aucune faiblesse chez les souris Δ Stau1 (Vessey, Macchi et al. 2008). Cependant, un déficit au niveau locomoteur a pu être observé (Vessey, Macchi et al. 2008).

5.5.2. Importance neurophysiologique de Stau2

5.5.2.1. Rôle de Stau2 dans la morphologie neuronale

Le rôle de Stau2 dans la transmission synaptique et la morphologie des épines dendritiques fut mis en évidence par l'utilisation d'un siARN contre celle-ci, réduisant ainsi les niveaux protéiques de Stau2 à leur plus faible. Il fut démontré que Stau2 jouait un rôle tant dans le nombre et la forme des épines que dans leur fonction synaptique (Goetze, Tuebing et al. 2006).

Ces neurones se développèrent avec une réduction marquée, soit une baisse de 50% de la quantité d'épines dendritiques matures, identifiées par la présence de la protéine PSD-95. L'absence de Stau2 diminua également, de 26%, la présence de boutons présynaptiques. Il faut cependant noter que les épines dendritiques matures restantes furent toujours retrouvées en association avec leur contrepartie présynaptique (Goetze, Tuebing et al. 2006). De plus, la présence de structures filopodales, de minces épines immatures de plus de 2µm, fut augmentée de 10 fois dans ces neurones (Goetze, Tuebing et al. 2006).

La spécificité de ces résultats fut démontrée par le renversement de ces phénotypes à la suite de l'expression d'un mutant d'ARNm de *Staufen2* insensible au RNAi. D'ailleurs, il fut intéressant de constater que l'expression de l'isoforme Stau⁶² eut de meilleurs résultats que celle de l'isoforme Stau⁵⁹, ce qui suggère que les ARNm transportés par ces différents isoformes jouent des rôles différents au niveau neuronal (Goetze, Tuebing et al. 2006).

Comme nous l'avons mentionné, le cytosquelette d'actine est grandement désorganisé dans ces neurones. La distribution de l'actine normalement retrouvée dans les épines dendritiques se retrouve maintenant à former de gros complexes au cœur de la dendrite et du corps cellulaire.

5.5.2.2. Rôle de Stau2 dans la transmission synaptique

Les changements morphologiques énumérés ci-haut se traduisent par une mesure de la transmission synaptique, le courant post-synaptique excitateur miniature « mEPSC », dramatiquement diminuée. La perte d'épines matures serait donc responsable de l'altération de l'intégrité de la transmission excitatrice. De plus, cet effet est principalement affecté au niveau post-synaptique. En effet, l'amplitude du courant des mEPSC, qui représente la sensibilité et le nombre de récepteurs post-synaptiques, est significativement diminuée. À l'inverse, la fréquence de ces décharges, qui représente l'exocytose des neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique, ne fut point modifiée. Cela confère à Stau2 un rôle principalement au niveau du compartiment post-synaptique plutôt que présynaptique. Enfin, la distribution de Stau2 le long de la dendrite et particulièrement dans l'épine synaptique, sous la structure post-synaptique dense, renforce l'hypothèse que celle-ci joue son rôle dans la formation ou le remodelage au niveau post-synaptique (Goetze, Tuebing et al. 2006).

Problématiques

Staufen fut d'abord étudiée chez la drosophile pour son rôle dans le transport et la localisation des ARNm de *bicoid* et d'*oskar* au pôle antérieur et postérieur de l'ovocyte, respectivement. Cette localisation permet aux structures de la tête, de l'abdomen et des cellules germinales de se développer. Pour ce faire, Staufen ce doit d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques, tels hrp48, Y14, Barentsz (Huynh, Munro et al. 2004)(Hachet and Ephrussi 2001)(van Eeden, Palacios et al. 2001).

Avant mon arrivée dans le laboratoire, une grande partie de la recherche était donc dirigée sur l'étude des paralogues et isoformes de la protéine Staufen dans les cellules de mammifères. En effet, la caractérisation des protéines Staufen1 et Staufen2 était déjà bien amorcée. La structure de ces divers isoformes était maintenant mieux comprise. Alors que chez la drosophile, Staufen possède cinq domaines de liaison à l'ARN de type dsRBD, nous savions maintenant que Stau1 et Stau2 possédaient chacun quatre dsRBD, mais que Stau1 ne possède pas le dsRBD1, alors que Stau2 manque le dsRBD5. Et que grâce à l'épissage alternatif, ces deux gènes s'expriment sous différents isoformes, soient Stau1⁵⁵, Stau1⁶³, Stau1¹ et Stau2⁵², Stau2⁵⁶, Stau2⁵⁹, Stau2⁶². (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Monshausen, Gehring et al. 2004) (Brizard, Luo et al. 2000).

Nous savions également que chaque dsRBD ne liait pas l'ARN avec la même affinité. En effet, le dsRBD3 montre la plus forte association à l'ARN double-brin, alors que les dsRBD2 et dsRBD5 sont dépourvus d'activité de liaison à l'ARN (Wickham, Duchaine et al. 1999). Nous savions également que Staufen avait la capacité de lier le cytosquelette via son domaine de liaison à la tubuline (TBD) (Wickham, Duchaine et al. 1999).

Enfin, il était connu que Staufen était localisée au niveau dendritique où il colocalisait avec l'ARN, ce qui suggère que Stau soit impliquée dans le transport et la

localisation de l'ARNm au niveau neuronal (Kohrmann, Luo et al. 1999; Tang, Meulemans et al. 2001). En effet, il avait été démontré que l'expression d'un dominant négatif de Stau2 au niveau neuronal diminuait le transport dendritique de l'ARN (Tang, Meulemans et al. 2001).

À partir de ces informations, voici donc les problématiques que nous avons voulu aborder dans cette thèse: aucun ARNm associé à Staufen n'avait été identifié au niveau des cellules de mammifère. Aucun partenaire protéique neuronal associé à Staufen n'avait été identifié jusqu'à présent. Et finalement, le rôle neurophysiologique de Staufen demeurait à être déterminé.

Hypothèse de recherches

Dans cette thèse, nous avons tenté de valider les hypothèses de travail suivantes : 1- Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² font partie de mRNP distincts et donc, sont associées à différentes populations d'ARNm; 2- Staufen2 s'associe à une population d'ARNm dont les fonctions sont importantes au niveau de la régulation neurophysiologique; 3- Staufen2 interagit avec divers partenaires protéiques qui permettent la régulation du transport et de la traduction localisés des ARNm qui lui sont associés; 4- La régulation de l'ARNm par les divers mécanismes moléculaires de Staufen1 (transport, traduction, dégradation) est importante pour la mise en œuvre de certains phénomènes neurophysiologiques.

Objectif de recherche

Voici donc les objectifs de recherche que nous nous sommes fixés à partir de ces hypothèses. Dans un premier temps, identifier les régulateurs d'ARNm associés aux divers isoformes de Staufen. Dans un deuxième, de caractériser au niveau moléculaire la composition des complexes neuronaux de Staufen2. Et enfin, de déterminer au niveau neurophysiologique le rôle de Staufen1.

De façon plus précise, nous avons cherché à identifier les ARNm associés à chacun de ces isoformes: Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²; à déterminer le degré de chevauchement des populations d'ARNm associées à Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²; à identifier et comparer la fonction des ARNm présents dans chaque complexe, en espérant pouvoir mieux caractériser la fonction physiologique de Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶².

Nous avons également entrepris d'identifier les ARNm neuronaux associés à Staufen2 endogène; de déterminer la fonction des ARNm présents dans ce complexe, afin de mieux définir le rôle de Staufen2 dans l'activité synaptique; d'identifier certains partenaires protéiques associés au mRNP neuronaux de Staufen2 et de caractériser l'association de Staufen2 avec ces facteurs protéiques.

Enfin, nous avons voulu déterminer l'importance de Staufen1 dans la mise en place des phénomènes synaptiques, tels la E-LTP, la L-LTP et la LTD, et caractériser l'importance de Staufen1 dans la morphologie des épines synaptiques

Approche expérimentale

Nous avons utilisé comme approche l'immunoprécipitation de la protéine étudiée suivi de l'identification des ARNm et des partenaires protéiques associés au complexe par micropuce et spectroscopie de masse, respectivement. La technique appelée « RIP-Chip » fut donc choisie afin d'identifier les ARNm associés à Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁶²-HA, Stau2⁵⁹-HA et Staufen2 endogène. Et les partenaires protéiques associés à Staufen2 neuronale furent identifiés par spectroscopie de masse à la suite de l'immunoprécipitation de Staufen2.

RÉSULTATS

ARTICLE 1: A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes

MISE EN CONTEXTE

Dans les cellules humaines, Stau1 et Stau2 sont codées par deux gènes distincts. Malgré la très grande similarité de séquence entre ces deux protéines, soit 51%, celles-ci font partie de complexes ribonucléoprotéiques distincts. De plus, par épissage alternatif, le gène de Stau2 génère deux isoformes de la protéine, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶², qui diffèrent uniquement en leur extrémité N-terminale. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si les populations d'ARNm liées par chacun de ces isoformes étaient semblables ou distinctes. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche génomique utilisant les micropuces d'ADN afin d'identifier les populations d'ARNm recueillies suite à l'immunoprécipitation de Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA et Stau2⁶²-HA. Le pourcentage de transcrite commun aux complexes de Stau1 et Stau2 est relativement faible. Celui-ci augmente lorsque l'on compare les ARNm présents à la fois dans les complexes de Stau2⁵⁹ et Stau2⁶². Fait intéressant, la fonction des transcrits présents dans ces trois complexes est semblable.

Cet article a été publié en février 2008 dans *RNA* aux pages 324-335

Contribution(s) des auteurs :

MML : culture cellulaire, immunoprécipitation, isolement de l'ARN, RT-PCR

LF : culture cellulaire, immunoprécipitation, isolement de l'ARN, étude bioinformatique des populations d'ARNm, écriture du manuscrit

LD : Figure de comparaison des paralogues, étude bioinformatique des populations d'ARNm, supervision générale et écriture du manuscrit

A genome wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes

Luc Furic*, Marjolaine Maher-Laporte*, and Luc DesGroseillers¹

Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre Ville,
Montréal, (Qué) Canada H3C 3J7

* The first two authors contributed equally to this work.

Short title: Microarray identification of Staufen-bound mRNAs

Key words: mRNA localization; RNA-protein interaction; ribonucleoproteins; Staufen; microarray;

¹Corresponding author:

Dr Luc DesGroseillers

Département de biochimie

Université de Montréal

P.O. Box 6128, station Centre Ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Phone : 514-343-5802

Fax : 514-343-2210

Emails : Luc DesGroseillers: 

ABSTRACT

Messenger RNAs are associated with multiple RNA-binding proteins to form ribonucleoprotein (mRNP) complexes. These proteins are important regulators of the fate of their target mRNAs. In human cells, Staufen1 and Staufen2 proteins, coded by two different genes, are double-stranded RNA-binding proteins involved in several cellular functions including mRNA localization, translation and decay. Although 51% identical, these proteins are nevertheless found in different RNA particles. In addition, differential splicing events generate Staufen2 isoforms that only differ at their N-terminal extremities. In this paper, we used a genome wide approach to identify and compare the mRNA targets of mammalian Staufen proteins. The mRNA content of Staufen mRNPs was identified by probing DNA microarrays with probes derived from mRNAs isolated from immunopurified Staufen-containing complexes following transfection of HEK293T cells with Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA or Stau2⁶²-HA expressors. Our results indicate that 7% and 11% of the cellular RNAs expressed in HEK293T cells are found in Stau1- and in Stau2-containing mRNPs, respectively. A comparison of Stau1- and Stau2-containing mRNAs identifies a relatively low percentage of common mRNAs; the percentage of common mRNAs highly increases when mRNAs in Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-containing mRNPs are compared. There is a predominance of mRNAs involved in cell metabolism, transport, transcription, regulation of cell processes and catalytic activity. All these subsets of mRNAs are mostly distinct from those associated with FMRP or IMP, although some mRNAs overlap. Consistent with a model of post-transcriptional gene regulation, our results show that Stau1- and Stau2-mRNPs associate with distinct but overlapping sets of cellular mRNAs.

INTRODUCTION

The regulation of gene expression at the post-transcriptional level is a mechanism widely used by cells to control protein synthesis with acute precision. In the majority of cases a sequence or a structure in the mRNA (*cis* element) is recognized by one or more proteins (*trans* factors) that assemble together in mRNPs and mediate an effect on mRNA metabolism. This interaction scheme has been shown to be involved in the intracellular localization of mRNA (Bashirullah, Cooperstock et al. 1998), in translational activation (Vagner, Galy et al. 2001) or repression (Chekulaeva, Hentze et al. 2006) and also in mRNA stabilization and decay (Brennan and Steitz 2001; Chen, Gherzi et al. 2001). Many RNA binding proteins that are *trans* factors can each associate with more than one mRNA species in the cell and it has been postulated that the networks of mRNAs bound by these proteins can serve as post-transcriptional operons (Keene and Tenenbaum 2002).

Staufen is an RNA-binding protein first discovered in *Drosophila* where it plays a role in oocyte patterning by localizing *oskar* and *bicoid* transcripts to the posterior and anterior poles, respectively (Riechmann and Ephrussi 2001). Staufen is also implicated in the translational derepression of *oskar* once localized at the posterior pole (Micklem, Adams et al. 2000). There are two mammalian homologs of Staufen termed Stau1 and Stau2 and they both possess four copies of the double stranded RNA-binding domain (dsRBD). Both Stau1 and Stau2 are expressed in the somato-dendritic compartment of neurons where they form distinct RNA granules visible as puncta in dendrites. Stau1 and Stau2 are also involved in mRNA transport along the microtubule tracts in neuronal dendrites (Kohrmann, Luo et al. 1999; Tang, Meulemans et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Kanai, Dohmae et al. 2004). More recently Stau1 was identified as a central component of a new mRNA decay mechanism termed Staufen-mediated decay (Kim, Furic et al. 2005). In addition to functions in RNA localization and decay, Stau1 can also

stimulate translation of repressed messengers containing structured RNA elements in their 5'UTR (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005).

Both genes produce multiple isoforms that are generated by alternative splicing. The *Stau1* gene generates at least 2 isoforms of 55 kDa (Stau1⁵⁵) and 63 kDa (Stau1⁶³) and one isoform that does not bind mRNA (Stau1ⁱ). This later isoform may be a regulator of Stau1 functions. Stau1 is found to be mainly associated with tubulo-vesicular structures in the cell as observed by microscopy and also found to co-fractionate with ribosomes and the rough endoplasmic reticulum in sucrose gradient (Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002). Similarly, the *Stau2* gene generates isoforms of 62 kDa (Stau2⁶²), 59 kDa (Stau2⁵⁹) and 52 kDa (Stau2⁵²)(Buchner, Bassi et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002). In a sucrose gradient of neuron extracts, Stau2⁶² is found in ribosome-free light complexes whereas Stau2⁵⁹ and Stau2⁵² co-fractionate with ribosomes.

Overall, Stau1 and Stau2 share 51% of amino acid sequence identity. When domains involved in mRNA binding (dsRBD3) are compared, the sequence identity between these proteins jumps to 77% (Figure 1). The question is whether these highly similar proteins bind overlapping populations of mRNAs or whether they associate with different subsets of mRNAs. The question is even more relevant for alternatively spliced Stau isoforms that are perfectly identical over domains involved in RNA binding. Answering these questions is fundamental for our understanding of Staufen functions in the cells and how they regulate redundant or specific pathways. To date, little is known about the RNA content of Staufen mRNPs. The present work was undertaken in an effort to identify the various mRNAs that are associated with Stau1 and Stau2 in mammalian cells and with differentially spliced Stau2 isoforms. The use of a genome wide screen using microarrays to identify mRNA subsets associated with RNA-binding proteins is a proven approach that was successfully applied in many studies. This technique termed RIP-Chip has been helpful to uncover the identity of the Fragile X mental retardation protein (FMRP) (Brown, Jin et al. 2001), YB1 (Evdokimova, Ruzanov et al. 2006), U2AF⁶⁵ (Gama-

Carvalho, Barbosa-Morais et al. 2006), Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein (IMP1) (Jonson, Vikesaa et al. 2007) and SLBP (Townley-Tilson, Pendergrass et al. 2006) co-purifying RNAs.

Here we report the first high throughput identification of Staufen associated mRNAs in human HEK293T cells. HA-tagged version of Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ and Stau2⁶² were transfected in HEK293T cells. After immunopurification, the RNA content of Staufen mRNPs was isolated and used to hybridize Affymetrix human gene chips. Hybridizations identified several probe sets with each immunopurified mRNPs. A high percentage of them are unique for Stau1 or Stau2 mRNPs. Enriched mRNAs were classified according to their cellular functions. Gene ontology (GO) annotations suggest that Staufen proteins are mainly involved in the regulation of cellular metabolism and physiological processes.

RESULTS

Stau1- and Stau2-containing RNP complexes co-purify with RNA

The aim of this study was to identify and compare mRNAs in different populations of Staufen-containing mRNPs as a mean to unveil the role(s) of these complexes in the cell regulatory pathways. Since Stau1 and Stau2 were described in different mRNP complexes, they may fulfill differential function by binding to alternative subsets of mRNAs (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). The same may be true for two Stau2 isoforms that were shown to be differentially distributed in cells (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Therefore, Human Embryonic Kidney (HEK) 293T cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA or Stau2⁶²-HA and Staufen-containing mRNPs were immunoprecipitated using a monoclonal anti-HA antibody for immunoprecipitation (IP). Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated from each mRNP extract and used to generate probes in order to hybridize microarrays. As control, immunoprecipitations with anti-HA antibodies were done on mock transfected cells. Western blot analysis showed that each Staufen-HA protein and isoform was efficiently immunoprecipitated (Figure 2A). To determine whether RNA co-purified with Stau1 and Stau2 complexes, RNA was isolated from the immunoprecipitates and visualized using RNA pico chips (Figure 2B). A clear enrichment of mRNA was observed in samples of immunopurified Staufen-containing RNPs as compared to controls in which very low amount of co-purifying RNA was detected. As expected, mainly two peaks corresponding to 18S and 28S ribosomal RNA were seen from HEK293T cells total RNA. These data showed that subpopulations of RNA co-immunoprecipitate with each Staufen isoform.

Microarray analysis of Staufen associated mRNAs

RNAs isolated from Staufen-HA and mock transfected cells were used as a source of probes to hybridize commercially available human DNA oligonucleotide microarrays from Affymetrix. This experiment allowed us to perform a genome wide identification of Stau1 and Stau2 associated mRNAs. To identify Staufen-HA associated mRNAs, we performed a statistical (unpaired) analysis on mean-scale normalized MAS5 data with P value threshold of 0.05. We then kept genes for which the hybridization signal was at least 2.5 times stronger with probes derived from Staufen-HA expressing cells than with probes made from their respective controls. Similarly, total RNA from untransfected HEK293T cells was used to generate probes for microarray hybridization.

First, arrays hybridized with probes synthesized from HEK293T cells total RNA showed that 19,491 probe sets corresponding to 12,188 unique genes are expressed in these cells. This corresponds to 37.3% of the total probe sets on the microarray. Then, in order to identify Stau1⁵⁵-HA associated mRNAs, four independent immunoprecipitations were performed from extracts of Stau1⁵⁵-HA transfected cells and mock transfected control cells. Hybridization results identified 1,384 probe sets (7% of expressed HEK293T mRNAs) that were enriched by more than 2.5 fold over control IP (Table S1). Similarly, two independent hybridization experiments performed with mRNA isolated from Stau2⁵⁹-HA transfected cells and controls identified 2,357 specific probe sets (12% of expressed HEK293T mRNAs) (Table S2). Using mRNA isolated from Stau2⁶²-HA transfected cells and controls, 2,008 (10% of expressed HEK293T mRNAs) probe sets were detected (Table S3).

A large percentage of mRNA is specific for either Stau1⁵⁵ - and Stau2-associated mRNPs

Then, the population of mRNAs associated with Stau1⁵⁵-HA mRNPs was compared to the mRNAs associated with Stau2-HA mRNPs (Figure 3). Our data indicated that 63% and 58% of the probe sets identified with the Stau1⁵⁵-HA derived probes were not found in Stau2⁶²-HA or Stau2⁵⁹-HA mRNPs, respectively, and 49% are specific to Stau1-containing mRNPs. The reverse is also true since 75% and 74% of the probe sets identified with Stau2⁵⁹-HA or Stau2⁶²-HA associated mRNAs, respectively, were not found among the Stau1⁵⁵ associated mRNA. These results are consistent with the previous reports that Stau1 and Stau2⁵⁹ and Stau2⁶² define different populations of RNA granules (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). Nevertheless, 368 probe sets were common to all Stau1-containing mRNPs.

Stau2⁶² - and Stau2⁵⁹-associated mRNPs share common mRNAs

Analyses of the Stau2-associated mRNAs revealed that a greater proportion of probe sets are shared by the two Stau2 isoforms as compared to what we described above for Stau1 vs Stau2. Indeed, only 33% of the probe sets identified with probes derived from Stau2⁶²-HA mRNPs were uniquely found in these mRNPs and 43% of the probe sets identified with probes derived from Stau2⁵⁹-HA mRNPs were specific for these mRNPs (Figure 3). A total of 1338 probe sets were common to both Stau2-containing mRNPs. These results revealed that, although found in different mRNP complexes, these differentially spliced Stau2 isoforms share several common mRNAs suggesting that they play overlapping and/or complementary roles that finely regulate similar cellular pathways.

RT-PCR validation of enriched mRNAs

According to the microarray analyses, we chose several mRNAs identified as being specifically enriched in Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA or Stau2⁶²-HA mRNPs to confirm their differential association with mRNPs (Table I). First, cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁶²-HA or Stau2⁵⁹-HA and the resulting proteins were immunoprecipitated with anti-HA antibodies. Immunoprecipitates from mock transfected cells were used as control. Western blot showed that the HA-tagged proteins have been immunoprecipitated in equal amounts (Figure 4A). Their expression was then compared to that of the endogenous proteins (Figure 4B,C). Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-PCR amplified with specific primers to validate the microarray results. As seen in Figure 5A, RNAs coding for FMN2 and IRF2BP2 were enriched in Stau1⁵⁵-HA containing mRNPs whereas RNAs coding for UQCRC2 and LTA4H and for MLLT11 and PPARGC1 were enriched in Stau2⁶²-HA and Stau2⁵⁹-HA containing mRNPs, respectively, as expected from the microarray analyses. Other mRNAs such as those coding for EIF5 and ZDHHC21 were common to Stau2 isoforms but not Stau1 mRNPs. Some of the precipitated mRNAs expected to be unique to one mRNP according to microarray analyses were nevertheless slightly enriched in the other mRNPs as compared to controls. It is possible that the overexpression of the tagged proteins has facilitated the formation of a relatively low number of heterogeneous granules with the endogenous proteins. Finally, mRNAs coding for BPNT1 and Acox1 that were enriched in each mRNP according to the microarray data are also common to mRNPs in the RT-PCR assay. RT-PCR amplification of serial dilutions of mRNAs commonly enriched in the three mRNPs indicated that the amplifications were in the linear range (Figure 5B,C). Consistent with the microarray data, these results show that specific mRNA can be differentially enriched in different mRNPs whereas others are common to both isoforms.

Then, we tested whether transcripts are also enriched in endogenous Stau1- and Stau2-containing mRNPs. Endogenous Stau1- and Stau2-containing mRNPs were immunopurified using anti- Stau1 and anti-Stau2 antibodies, respectively. Non-immune sera were used as controls. Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-PCR amplified with specific primers. Consistent with the microarray data, mRNAs coding for IRF2BP2, FMN2 and ZNF236 were enriched in the Stau1 mRNP extracts as compared to their respective controls (Figure 6A). Except for IRF2BP2 mRNA, they were not enriched in Stau2-containing mRNPs (Figure 6B). Similarly, mRNAs coding for EIF5, LTA4H and TXNDC9 were enriched in Stau2-containing mRNPs as compared to controls (Figure 6B). However, an enrichment was also seen in Stau1 immunoprecipitates as compared to controls (Figure 6A) suggesting either that the anti-Stau1 antibody is not as specific as observed by Western blotting or that the endogenous Stau1-containing granules are more heterogeneous than expected. If so, the number of mRNAs common to Stau1- and Stau2-containing mRNPs may well be slightly higher than that seen by microarrays. Other mRNAs that were not enriched in the mRNPs over the controls in the microarray analyses also showed no enrichment by RT-PCR analysis being found in both mRNP and controls. Altogether, these results confirm that specific mRNAs are preferentially found in Stau1- or Stau2-containing mRNPs as revealed by the microarray analyses but the number of common mRNAs may be slightly underestimated.

Enriched mRNAs are involved in diverse cellular functions

We next tried to identify pathways in which Stau1 and Stau2 are involved as a mean to understand the biological functions of Staufen. Probe set lists have been analyzed with the DAVID functional annotation tool (Dennis, Sherman et al. 2003) to assign cellular functions to mRNAs that were enriched in Staufen-containing RNPs. The result from GO classification reveals that mRNAs associated with Stau1- and Stau2-containing RNPs are

roughly distributed in the same functional and molecular categories (Tables 2 and S4). These include mRNAs coding for genes involved in cellular metabolism and cellular physiological processes, localization and transport, transcription, alternative splicing, metal-ion binding and catalytic activities. Similarly, the sub-cellular distribution of the proteins encoded by the probe sets is quite similar between Stau1- and Stau2-associated mRNAs. Probe sets were then analyzed with the Babelomics software (Al-Shahrour, Minguez et al. 2005) to identify common probe sets in each GO category. Interestingly, despite the fact that Stau1- and Stau2-derived probe sets are essentially distributed in the same functional categories, the nature of the genes encoded by these probe sets is quite different in each category (Tables S5), only about 30% of them being common. These results suggest that Stau1 and Stau2 play complementary roles that nevertheless fulfill similar functions.

GO classification was also done with mRNAs associated with Stau2⁶² and Stau2⁵⁹ mRNPs (Tables 2 and S4). RNAs associated with these mRNPs are linked to the same GO categories. In addition, in each category, about 60% of the genes are common (Table S6), suggesting that they play redundant functions.

DISCUSSION

Staufen-bound mRNAs

Staufen proteins are RNA-binding proteins ubiquitously expressed in animals that play several roles in mRNA transport, translation and mRNA decay. Therefore, they are likely multifunctional proteins involved in several pathways and consequently should bind mRNAs that are not necessarily functionally related. In this paper, a genome wide approach was used to identify mRNAs that are associated with either Stau1- or Stau2-containing particles. Independent RT-PCR analyses of several putative mRNA targets confirmed the reliability of this technique. Our results further indicate that these mRNAs are components of endogenous Stau1- and/or Stau2-containing mRNPs. The gene ontology distribution of these mRNAs allowed us to unveil the major pathways in which Stau1 and Stau2 proteins are involved. Our results with the microarray screens indicate that Stau1 and Stau2 associate with different but overlapping populations of mRNAs and that these mRNAs are nevertheless involved in common pathways. It is consistent with the high degree of sequence similarity between Stau1 and Stau2 that predicts that they may have conserved convergent functions and with the observation that they are distributed in distinct mRNP complexes in neurites. However, the more sensitive RT-PCR experiment suggests that the affinity of specific mRNAs for Stau1- or Stau2-containing mRNPs may not be all or none. Indeed, following overexpression of tagged proteins, mRNAs are enriched in specific mRNPs as predicted by the microarray analyses but most of them are also enriched in the other IPs relative to the control although to a lesser degree of enrichment. The same trend is observed with the endogenous mRNPs especially in Stau1-containing complexes. Although it could be due to technical limitations (overexpression, specificity of antibodies, variation in the amounts of mRNA in the controls), the sequence similarity between Stau1 and Stau2 may also explain the fact that mRNA can bind to the two Staufen paralogs with differential affinity. It may allow to more precisely regulate the post-transcriptional expression of these

mRNAs according to cell needs. Alternatively, it is possible that a certain percentage of heterogeneous granules may form in these cells causing the immunoprecipitation of both paralogs in different proportions.

This study also allows us to identify the level of divergence in the RNA content of two mRNPs that contain protein isoforms with identical RNA-binding domains. Stau2⁶² and Stau2⁵⁹ are differentially spliced isoforms that only differ at their N-terminal extremity. In neurons, they form distinct mRNPs that fractionate with ribosome-free RNPs and with ribosomes, respectively (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Our results indicate that these mRNPs contain a high percentage of shared mRNAs suggesting that these isoforms play redundant functions. However, about a third of the associated mRNAs are unique to either Stau2⁶² or Stau2⁵⁹ mRNPs indicating that the Stau2 RNA-binding domain is not the sole determinant for the selection of associated mRNAs. It is consistent with proteomic analyses that showed that RNA granules contain several RNA-binding proteins that may, in theory, bind specific mRNAs. RNA granules are likely heterogeneous particles composed of several RNA-binding proteins and their associated RNAs. Stau2 was indeed found in several RNA granules along with other RNA-binding proteins such as pur proteins, DeadBox helicases, FMRP and hnRNPs (Ohashi, Koike et al. 2002; Elvira, Wasiak et al. 2006). All of them may bind RNA and associate with Stau2 to form RNA granules. Alternatively, the accessibility of specific RNAs and/or the composition of specific RNPs may be dictated by the availability of mRNA subpopulations in subcellular compartments allowing specific association with differentially distributed Stau2 isoforms.

GO distribution

RNAs associated with Stau1- and Stau2-containing mRNPs essentially fall in the same GO categories suggesting that these paralogues have overlapping and/or complementary functions. Although broadly distributed in several GO categories, these

mRNAs code for proteins mainly involved in cell metabolism, cellular physiological processes, localization and transport, transcription, alternative splicing, metal-ion binding and catalytic activities. These are cellular processes that need fine regulation to appropriately respond to cell needs and cell stimuli. Stau1-dependent post-transcriptional regulation of gene expression of a specific subpopulation of messengers would allow a cell to specifically and quickly respond to cell stimuli. Post-translational modifications of mRNP-associated proteins, such as phosphorylation, may transduce the external stimuli into functional responses. Indeed, phosphorylation of the zipcode-binding protein ZBP1 by the protein kinase Src results in the dissociation of repressed mRNAs from mRNPs and in their translation on polyribosomes (Huttelmaier, Zenklusen et al. 2005).

Of interest is also the association between Stau1- and Stau2-bound mRNAs and localization and transport. It is well documented that one of the functions of both Stau1 and Stau2 is related to mRNA transport and localization. In polarized cells such as neurons, Stau1 and Stau2 are found in the form of RNA granules that move in dendrites (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Kohrmann, Luo et al. 1999; Tang, Meulemans et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Barbee, Estes et al. 2006; Kim and Kim 2006). Down-regulation of Stau1 using RNAi or impaired transport of Stau2 following expression of a dominant negative mutant both reduce the transport of mRNA in dendrites. Our results now suggest that Stau1 and Stau2 may also regulate their own function by controlling the post-transcriptional expression of proteins involved in the mechanics of transport and localization. Similarly, several mRNAs are linked to the ubiquitination process. To finely regulate signals induced by cell stimulation, it is important to quickly inactivate and/or eliminate signaling proteins. One efficient pathway relies on protein degradation by the proteasome, a process that is dependent on the ubiquitination of proteins to be degraded (Ciechanover, Orian et al. 2000). It is likely that mRNA transport and local translation is balanced by local protein degradation, allowing fine regulation of cell signaling. Components of the proteasome are found in dendrites and the function of the proteasome is

necessary for long term potentiation (Hegde, Inokuchi et al. 1997; Fonseca, Vabulas et al. 2006; Karpova, Mikhaylova et al. 2006).

Comparison to other RNPs

Our data indicate that there is an overlap between Stau1 and Stau2 associated mRNAs. We decided to look if there is also an overlap with other known mRNA populations associated with other RNA-binding proteins. FMRP is the product of the *Fmr1* gene. Absence or mutation of FMRP causes the Fragile X syndrome an X-linked form of mental retardation. It has been shown that FMRP is involved in translational repression and in synaptic plasticity (Zalfa, Achsel et al. 2006). It was reported that FMRP co-purifies with at least 432 different mRNAs following immunoprecipitation from mouse brain extracts (Brown, Jin et al. 2001). FMRP is also found in complex with Stau1 (Brendel, Rehbein et al. 2004; Villace, Marion et al. 2004) which suggest that there could be a common set of target mRNAs for both proteins. In order to test this possibility, we wanted to compare the 432 mRNAs previously identified as potential FMRP targets with the Stau1⁵⁵-HA associated mRNA population identified in the present study. Unfortunately, it is hard to gain a global picture of the relationships that exist between the RNA content of different mRNPs that were characterized using RIP-chip approach. Comparisons are difficult to make between datasets available in the literature because of high variations in 1) the array platforms that are used; 2) the tissue or cell type used as starting material; 3) the developmental stage at which the experiment was conducted, and 4) the species that were used to study mRNA content of mRNPs. Nevertheless, we first performed a search for probe sets corresponding to the human orthologs of mouse probe sets. From the 432 probe sets corresponding to FMRP associated mRNAs, 375 probe sets possess a human ortholog. These 375 probe sets represent 355 unique genes. Human U133 gene chip contains 1363 probe sets that represent the orthologs of the 375 mouse probe sets. Of these 1363 probe

sets, 58 (4.3%) are enriched in Stau1⁵⁵-HA purification. These 58 probe sets represent 52 unique genes which leads to the conclusion that approximately 15% (52/355) of FMRP associated mRNAs are also enriched in Stau1⁵⁵-HA purification (Table 3). Similarly, the population of mRNAs associated with Stau1 is distinct from that of mRNA bound to the human zipcode binding protein IMP. Indeed, only 26 probe sets (Table 4) are common among the 352 (7%) probe sets in IMP1 complexes and Stau1 (1.6%) complexes. These two RNA granules do not colocalize in HEK293T cells (Jonson, Vikesaa et al. 2007).

Staufen-binding site

To understand the precise role of Staufen in mammalian cells, it will be necessary to determine how Staufen regulates the fate of each of its associated mRNA and therefore how it regulates the function of the encoded protein. First, it must be determined whether Stau1 or Stau2 directly bind RNP-associated RNAs or whether these RNA copurify by virtue of their binding to other RNA-binding proteins in the complexes. This is not a trivial task since Stau1 binds any structured RNA *in vitro* (Ramos, Bayer et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Ramos, Grunert et al. 2000). Second, the RNA structure of the Stau1- and Stau2-binding sites and their position relative to the 5'- or 3'UTR of each mRNA must be determined. The position of the Stau1-binding site in a particular mRNA is of primary importance since it dictates whether the mRNA is targeted to polysomes for enhanced translation (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005) or is degraded by the Stau1-mediated mRNA decay pathway (Kim, Furic et al. 2005). Although a gene by gene approach is required at least at the beginning to characterize the Staufen1-binding site, an *in silico* high throughput technique to assess where Stau1 binds to a given group of mRNAs would facilitate the search. The classification presented here of Stau1- and Stau2-associated mRNAs in functional subclasses will be helpful in orienting further studies. We recently reported that Stau1 binds to a stem of 19 nucleotides in the 3'UTR of the Arf1 mRNA (Kim, Furic et al.

2007). However, the critical features that confer specific binding for Stau1 are still unclear and adjacent uncharacterized region(s) are also needed for optimal binding. Indeed, *in silico* analyses of several Stau1-target mRNAs failed to identify a 19 nt stem in these mRNAs, indicating that the recognition element is probably more complex than a single stem. This is consistent with the Staufen-binding site in the *Drosophila bicoid* mRNA that included three stem-loops (Ferrandon, Elphick et al. 1994). Similarly, other dsRNA-binding proteins were shown to bind complex RNA structures composed of stems, bulges and loops (Herbert and Rich 2001; Hallegger, Taschner et al. 2006). The nature of the Stau2-binding site is completely unknown.

We previously reported a partial list of Stau1-associated mRNAs using the 22,000 probe sets microarrays from Affymetrix (Kim, Furic et al. 2005). We now extend this list with four additional independent hybridizations of the 54,000 probe sets microarrays. Among the 23 previously identified Stau1-associated mRNAs, 9 are present in the new Stau1⁵⁵-HA analysis. Notably the probe set corresponding to *Arf1* is not present in the list. However, *Arf1* mRNA has been shown to be a real target of Stau1 (Kim, Furic et al. 2005) and its Stau1-binding site in the 3'UTR identified (Kim, Furic et al. 2007). Careful analysis of the novel hybridizations indicates that the probe set corresponding to *Arf1* is enriched at least 2.5 fold over the controls in 3 of the 4 hybridizations. This is also true for all other previously identified probe sets that are either enriched in the 4 new microarrays but were not retained in this study because of their p-values above the threshold (3 probe sets), or are enriched in 2 (5 probe sets) or 3 (5 probe sets) of the 4 new hybridizations. Therefore, although not statistically significant, these probe sets are likely targets for Stau1. Indeed, if microarray data are analyzed using the data processing method RMA (Robust Multi-array Average), 19 out of the 23 previously identified mRNAs (including *Arf1*) are identified. These data suggest that more mRNAs than those in the list may be associated with Stau1.

We have for the first time showed, by an unbiased approach, that Stau1 and Stau2 associate with different although overlapping subsets of mRNAs in the cells. Interestingly,

mRNAs associated with Stau1- and Stau2-containing mRNPs code for proteins that are sorted in similar GO categories suggesting that the two paralogs play complementary roles in mammalian cells. It is possible that during evolution the *Stau* gene has duplicated to finely regulate specific pathways. Differential splicing events in each gene then allow a further diversification of the repertoires of possible functions. Altogether our results are consistent with the post-transcriptional operon hypothesis (Keene and Tenenbaum 2002) for concerted expression of functionally related genes in specific pathways.

MATERIALS AND METHODS

Immunopurifications

HEK293T cells were propagated in DMEM medium supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone). 3×10^6 cells were plated in 150 mm Petri dishes and transfections were performed 24 hours after plating. Cells were transfected with one of the following plasmids: Stau1⁵⁵-HA₃ (Duchaine, Wang et al. 2000), Stau2⁵⁹-HA₃ or Stau2⁶²-HA₃ (Elvira, Massie et al. 2006) using calcium-phosphate co-precipitate technique. Mock cells transfected with untagged expressing vectors or the vector alone were used for control. More than 80% of the cells were transfected. Cells were collected and lysed 48 hours after transfection. Immunopurification, using anti-HA antibody, was performed as previously described (Duchaine, Wang et al. 2000) except that *E. coli* tRNA (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 200 µg/mL during the incubation with Protein-A-Sepharose (GE healthcare). After extensive washing the resin was incubated 5 min at 95°C in 1X Laemmli buffer. 1/10 of the eluate was kept for Western blot analysis; the remaining of the sample was used for RNA extraction. A rabbit polyclonal anti-HA antibody (Sigma) and western blotting were used to detect transfected Stau1-HA and Stau2-HA proteins.

Microarray analysis

RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen). RNA pellet was solubilized in water and residual contaminants were removed using RNA nanoprep column (Stratagene). Biotinylated-cRNA probes were synthesized by the two-cycle target labeling assay following Affymetrix procedure. Affymetrix Human genome arrays (HG-U133_Plus_2 : comprising 52,245 probe sets that correspond to 29,555 unique genes) were used for hybridization accordingly to Affymetrix guidelines. Hybridized chips were scanned using

an Affymetrix GeneChip 3000 Scanner. Results were recorded using the GeneChip Operating Software (GCOS) platform, which includes the GeneChip Scanner 3000 high-resolution scanning patch that enables feature extraction (Affymetrix). Notably, the Affymetrix Gene Expression Assay identifies changes that are greater than 2-fold with 98% accuracy (Wodicka, Dong et al. 1997).

To identify mRNAs that specifically co-purify with Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA, signal intensities obtained for specific IPs were compared to the baseline signal intensities of control IPs using statistical analysis on mean-scale normalized MAS5 data with a p value limit of 0.05. The same methodology was used to compare microarrays hybridized with cRNAs synthesized from specific IPs to cRNAs synthesized from total RNA content of HEK293T cells. Each probe set presenting a fold enrichment over control of more than 2.5 was scored as a potential Staufen associated mRNA. Only the probe sets showing a difference of more than 200 arbitrary units of intensity between the IP and control were kept for further analysis. Complete microarray analysis results can be found in Supplemental data. Microarray data have been deposited in the GEO database and are available through the series accession number GSE8437 and GSE8438.

RT-PCR amplification

RT-PCR was performed as previously described (Kim, Furic et al. 2005). Primer pairs are listed in Table S7.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Genome Quebec Innovation Centre, in particular André Ponton, for microarray screening and analysis. We also thank Kirill Tarassov for comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.D.G. L.F. and MML were supported by scholarships from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), respectively.

REFERENCES

- Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. 2005. BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic acids research* 33:W460-464.
- Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Collier JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, Brand AH, Newbury SF, Wilhelm JE, Levine RB, Nakamura A, Parker R, Ramaswami M. 2006. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52:997-1009.
- Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. 1998. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67:335-394.
- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384:239-246.
- Brennan CM, Steitz JA. 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58:266-277.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107:477-487.
- Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B. 1999. Identification of a novel homolog of the Drosophila staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62:113-118.
- Chekulaeva M, Hentze MW, Ephrussi A. 2006. Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* 124:521-533.

- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M. 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107:451-464.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22:442-451.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4:P3.
- Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. 2000. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* 20:5592-5601.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science* 115:3285-3295.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Elvira G, Massie B, DesGroseillers L. 2006a. The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96:105-117.
- Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS. 2006b. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5:635-651.
- Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, Buckley J, Triche TJ, Sonenberg N, Sorensen PH. 2006. Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26:277-292.

- Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St Johnston D. 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV. 2006. A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52:239-245.
- Gama-Carvalho M, Barbosa-Morais NL, Brodsky AS, Silver PA, Carmo-Fonseca M. 2006. Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic-shuttling mammalian splicing factors. *Genome Biol* 7:R113.
- Hallegger M, Taschner A, Jantsch MF. 2006. RNA aptamers binding the double-stranded RNA-binding domain. *RNA (New York, NY)* 12:1993-2004.
- Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH. 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 89:115-126.
- Herbert A, Rich A. 2001. The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the in vivo editing of minimal substrates by ADAR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12132-12137.
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438:512-515.
- Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen TV, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC. 2007. Molecular composition of IMP1 RNP granules. *Mol Cell Proteomics*.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.

- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T. 2006. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* 26:4949-4955.
- Keene JD, Tenenbaum SA. 2002. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9:1161-1167.
- Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, Ortin J, Dotti CG. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19:288-297.
- Kim KC, Kim HK. 2006. Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neuroscience letters* 397:48-52.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
- Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, Desgroseillers L, Maquat LE. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal* 26:2670-2681.
- Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10:2945-2953.
- Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D. 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19:1366-1377.
- Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K. 2002. Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *The Journal of biological chemistry* 277:37804-37810.

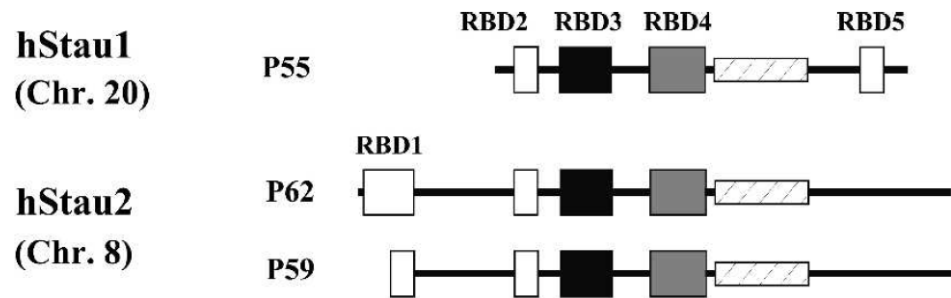
- Ramos A, Bayer P, Varani G. 1999. Determination of the structure of the RNA complex of a double-stranded RNA-binding domain from *Drosophila* Staufen protein. *Biopolymers* 52:181-196.
- Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, Freund S, Bycroft M, St Johnston D, Varani G. 2000. RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *The EMBO journal* 19:997-1009.
- Riechmann V, Ephrussi A. 2001. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11:374-383.
- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. 2001. A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32:463-475.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL. 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Molecular biology of the cell* 16:405-420.
- Townley-Tilson WH, Pendergrass SA, Marzluff WF, Whitfield ML. 2006. Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *Rna* 12:1853-1867.
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2:893-898.
- Villace P, Marion RM, Ortin J. 2004. The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32:2411-2420.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. 1999. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* 19:2220-2230.
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 15:1359-1367.
- Zalfa F, Achsel T, Bagni C. 2006. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:265-269.

FIGURES AND LEGENDS

FIGURE 1: Comparison of the Staufen paralogues.

(A) Schematic representation of Stau1⁵⁵ (P55), Stau2⁵⁹ (P59) and Stau2⁶² (P62). Black and grey boxes represent the major and minor RNA-binding domains, respectively. White boxes represent domains that do not bind RNA even if they show sequence similarity to RNA-binding domains. Hatched boxes represent the tubulin-binding domain. RBD, RNA-binding domain. Chr, chromosome. (B) Sequence comparison of Stau1 and Stau2 dsRBD3. Amino acids are indicated by the one letter code.

FIGURE 1



dsRBD3 (sequence identity: 77%)

```

Stau1 KSEISQVFEIALKRNLVNFVARESGPPHMKNFVTKVSVGGEFVGEGERGKSKKISKKNAAI AVL EEL
      ::::: :::::::::::::::::::: .:::::::::::::::::::::::::: ::::: ::::: ::: :::::
Stau2 KSEISLVFEIALKRNPVSFEVIKESGPPHMKS FVTRVSVGGEFSAEGEGNSKKLSKKRAATTVLQEL
  
```

FIGURE 2: Stau1 and Stau2 co-purify with RNA.

(A) Immunoprecipitation of Staufen-HA constructs. HEK293T cells were either transfected with one of the plasmids expressing Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA or Stau2⁶²-HA or mock transfected to control for nonspecific immunoprecipitation. Two days post-transfection, cells were lysed and a fraction of the cell lysates was immunopurified using a mouse monoclonal anti-HA antibody. Stau1⁵⁵-HA (lane 1), Stau2⁵⁹-HA (lane 2) and Stau2⁶²-HA (lane 3) were identified on Western blotting using a rabbit polyclonal anti-HA antibody. Lane 4 corresponds to the IP of mock transfected cells. (B) Analysis of the RNA content of Staufen-containing mRNPs. From the immunoprecipitates described in (A), RNA was extracted and run on a Bioanalyser RNA pico chip (Agilent) as indicated. Total RNA was also extracted from HEK293T cells. Migration profile of HEK293T cells total RNA sample shows mainly two peaks corresponding to 18S and 28S ribosomal RNAs. Note that Bioanalyser profiles are not all plotted on the same absorbance scale.

FIGURE 2

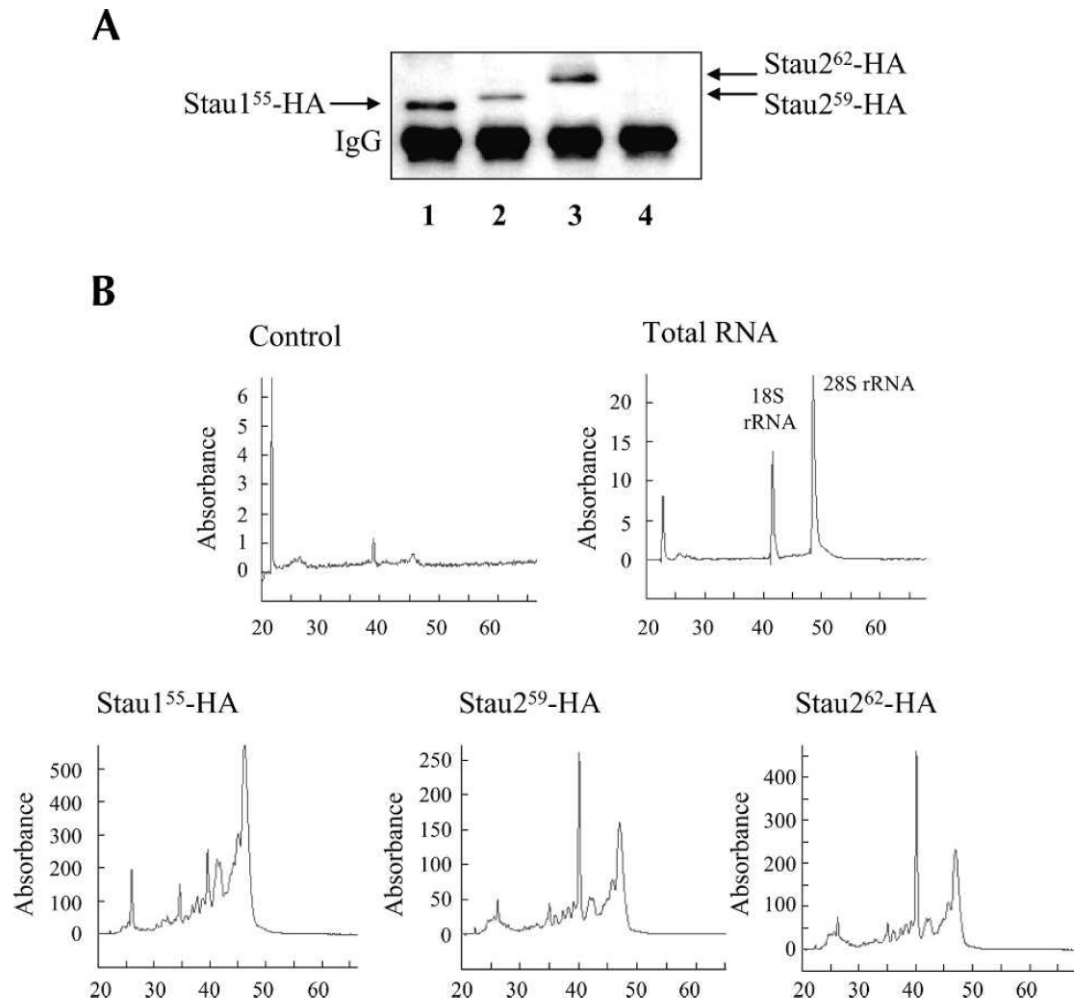


FIGURE 3: Venn diagrams summarizing microarray analysis results.

The RNA content isolated from Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA IP (Figure 2) was used to synthesize cRNA probes in order to hybridize Affymetrix HG_U133_plus_2 microarrays. For each hybridization, probe sets showing an enrichment of at least 2.5 fold over the control IPs were identified. The numbers of probe sets that are either specific or common to Stau proteins are plotted in Venn diagrams.

FIGURE 3

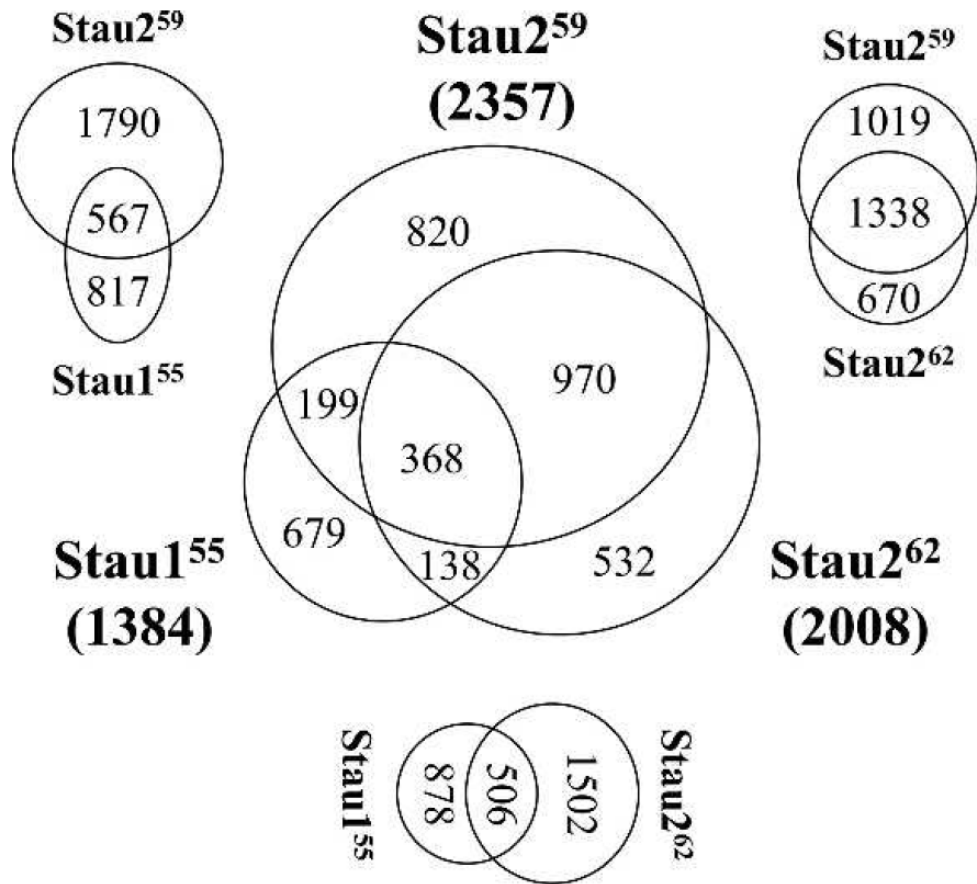


FIGURE 4: Expression of Staufen-tagged proteins.

HEK293T cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA (St1⁵⁵), Stau2⁶²-HA (St2⁶²) or Stau2⁵⁹-HA (St2⁵⁹). Mock-transfected cells were used as controls (Ctl). 48 hours post-transfection, cells were lysed and Staufen-containing mRNPs were immunoprecipitated (IP) using anti-HA antibodies. Proteins in the immunoprecipitates were analyzed by Western blot analysis using anti(α)-HA (A), anti-Stau1 (B) or anti-Stau2 (C) antibodies.

FIGURE 4

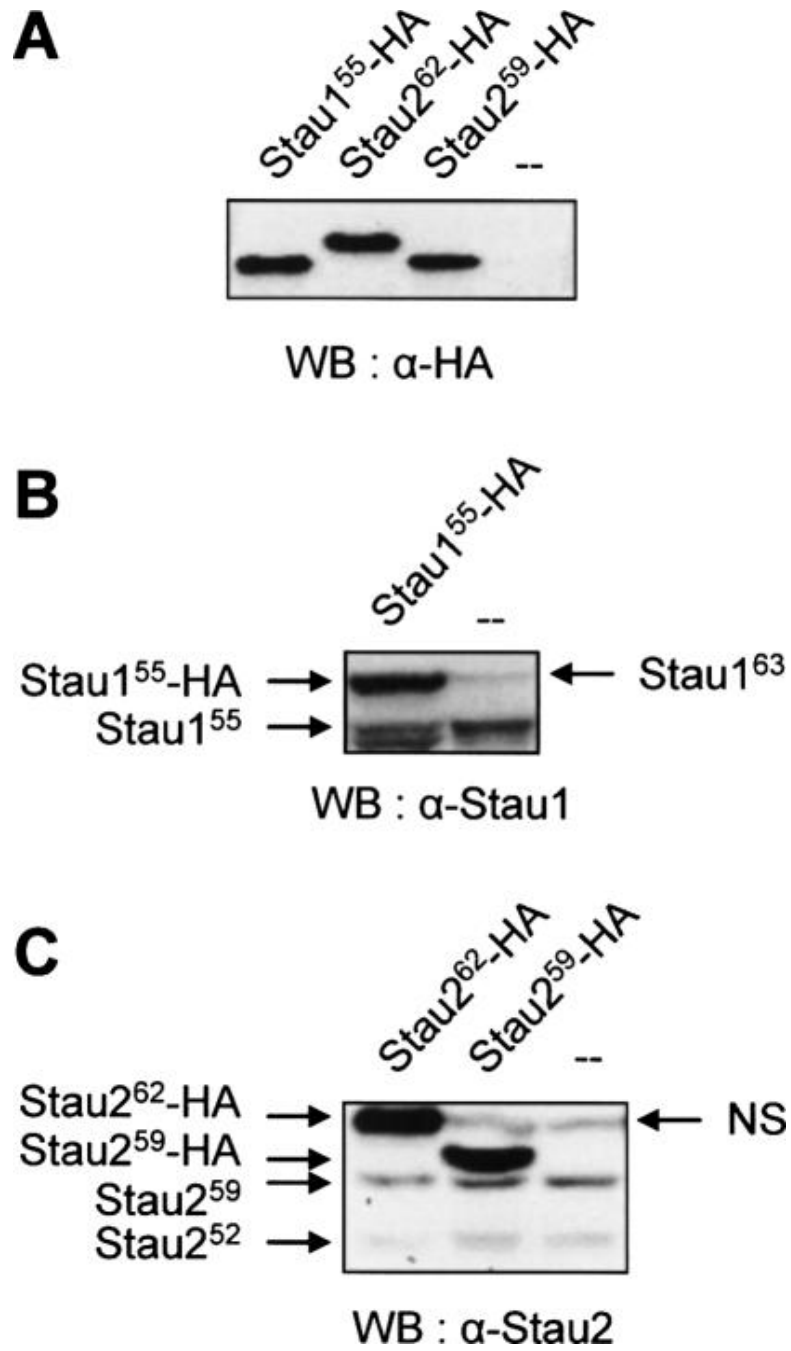


FIGURE 5: RT-PCR amplification of selected mRNA following mRNPs immunoprecipitation.

HEK293T cells were transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA (St1⁵⁵), Stau2⁶²-HA (St2⁶²) or Stau2⁵⁹-HA (St2⁵⁹). Mock-transfected cells were used as controls (Ctl). 48 hours post-transfection, cells were lysed and Staufen-containing mRNPs were immunoprecipitated (IP) using anti-HA antibodies. Co-immunoprecipitated mRNAs were purified and RT-PCR amplified with pairs of oligonucleotides specific for the indicated genes (Table S7). (A) Genes were chosen according to their differential enrichment in Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA mRNPs according to the microarray data. Serial dilutions of mRNA in the immunoprecipitates (B) or in cell extracts (C) were used to indicate that RT-PCR amplifications were in the linear range. FMN2, forming 2; IRF2BP2, interferon regulatory factor 2 binding protein 2; LTA4H, leukotriene A4 hydrolase; EIF5, eukaryotic translation initiation factor 5A; Acox1, acyl-Coenzyme A oxidase 1 palmitoyl; BPNT1, 3'(2') 5'-bisphosphate nucleotidase 1; MLLT11, ALL1-fused gene from chromosome 1q; PPARGC1, peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1; UQCRC2, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II; ZDHHC21, zinc finger DHHC domain containing 21.

FIGURE 5

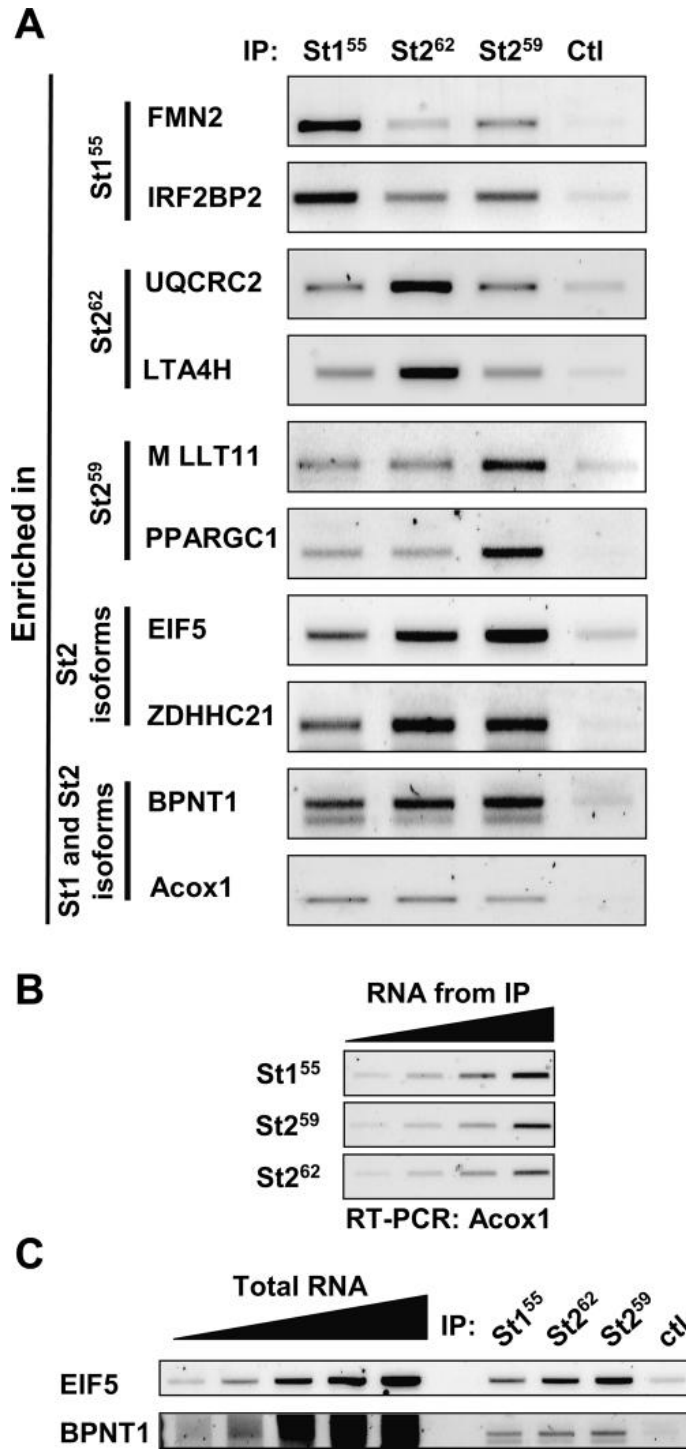
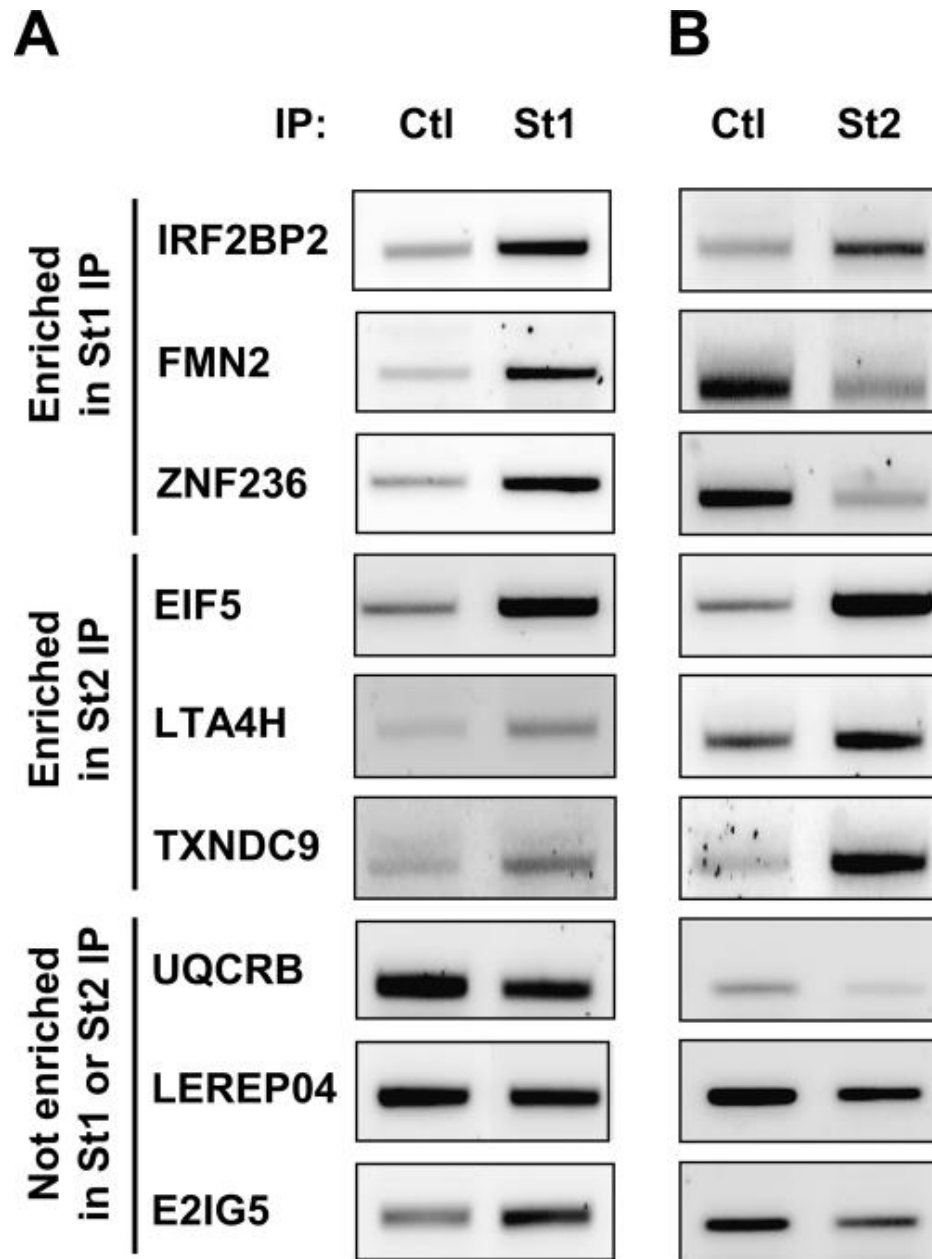


FIGURE 6 : RT-PCR amplification of selected endogenous mRNA following Stau1 or Stau2 immunoprecipitation.

HEK293T cells were lysed and Stau1- (A) or Stau2-(B) containing mRNPs were immunoprecipitated (IP) with mouse monoclonal anti-Stau1 (St1) or rabbit polyclonal anti-Stau2 (St2) antibodies, respectively. Immunoprecipitation with preimmune sera was used as controls (Ctl). Co-immunoprecipitated mRNAs were isolated and RT-PCR amplified with pairs of oligonucleotides specific for the indicated genes (Table S7). IRF2BP2, interferon regulatory factor 2 binding protein 2; FMN2, formin 2; ZNF236, zinc finger protein 236; EIF5, eukaryotic translation initiation factor 5A; LTA4H, leukotriene A4 hydrolase; TXNDC9, thioredoxin domain containing 9; UQCRB, ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein; LEREPO4, likely ortholog of mouse immediate early response erythropoietin 4; E2IG5, growth and transformation-dependent protein.

FIGURE 6



TABLEAUX

TABLE 1: List of genes differentially found in Stau1 or Stau2 mRNPs and used for RT-PCR amplification

Gene name	Symbol	Probe set	Fold increase in RNP as compared with controls		
			Stau1 ⁵⁵	Stau2 ⁶²	Stau2 ⁵⁹
Probe sets enriched in Stau1 ⁵⁵ mRNPs					
Formin 2	FMN2	223618_at	3.4	0.8	1.0
Interferon regulatory factor 2 binding protein 2	IRF2BP2	224570_s_at	4.2	0.9	1.1
Zinc finger protein 236	ZNF236	222227_at	17.7	0.3	0.6
Probe sets enriched in Stau2 ⁶² mRNPs					
Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	208771_s_at	1.1	2.7	0.8
Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	UQCRC2	212600_s_at	1.3	3.5	1.1
Probe sets enriched in Stau2 ⁵⁹ mRNPs					
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated 11	MLLT11	211071_s_at	2.1	2.1	5.5
Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1	PPARGC1	219195_at	1.0	1.6	3.0
Probe sets enriched in both Stau2 ⁵⁹ and Stau2 ⁶² mRNPs					
Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5	208707_at	1.3	4.9	6.8
Zinc finger DHHC domain containing 21	ZDHHC21	243835_at	0.7	3.7	5.7
Thioredoxin domain containing 9	TXNDC9	203008_x_at	1.3	7.0	4.0
Probe sets enriched in both Stau1 ⁵⁵ and Stau2 ⁶² mRNPs					
Acyl-Coenzyme A oxidase 1 palmitoyl	Acox1	227962_at	8.7	8.1	6.7
3'(2') 5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1	232103_at	9.8	8.6	4.8
Control probe sets					
Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	UQCRB	209065_at	0.3	0.2	0.2
Likely ortholog of immediate early response erythropoietin 4	LEREPO4	201595_s_at	0.3	0.06	0.08
Growth and transformation-dependent protein	E2IG5	221533_at	2.4	2.1	1.3

TABLE 2: Summary of DAVID GO classification of target mRNA population

TABLE 2. Summary of DAVID GO classification of target mRNA population				
Gene ontology group	HEK293 (%)	Stau1 ⁵⁵ (%)	Stau2 ⁵⁹ (%)	Stau2 ⁶² (%)
Activator	1.95	2.20	2.2	2.3
Alternative splicing	18.52	18.04	18.0	18.2
Catalytic activity	25.77	22.44	24.6	25.4
Cellular metabolism	36.88	30.02	34.0	34.3
Cellular physiological process	48.72	41.70	46.8	46.6
Cellular protein metabolism	15.02	12.74	14.5	15.4
Establishment of protein localization	3.72	3.26	4.1	3.4
Glycoprotein metabolism		1.06	1.0	1.0
Ligase activity	2.98	3.03	3.4	4.1
Ligase activity, forming carbon–nitrogen bonds	2.21	2.58	2.9	3.5
Macromolecule metabolism	22.95	18.50	20.3	21.4
Magnesium ion binding	1.67	1.90	2.1	2.2
Metabolism	39.12	32.15	36.0	36.2
Metal binding	11.62	11.37	11.8	12.3
Mutagenesis site	5.45	5.84	5.8	6.0
Nucleic acid metabolism	17.99	14.18	15.8	15.5
Physiological process	51.69	44.20	49.4	49.1
Primary metabolism	35.98	29.64	33.6	33.6
Protein catabolism	1.26	1.29	1.7	1.8
Protein degradation	0.20	0.53	0.4	0.4
Protein localization	3.81	3.34	4.2	3.5
Protein metabolism	16.33	13.80	16.1	16.8
Protein modification	8.63	8.26	10.2	10.7
Protein transport	3.63	3.11	4.1	2.4
Protein ubiquitination	1.39	1.67	1.8	2.3
Regulation of cellular metabolism	11.94	10.46	11.2	11.2
Regulation of cellular physiological process	16.15	14.10	15.3	14.7
Regulation of metabolism	12.28	10.46	11.4	11.4
Regulation of nucleic acid metabolism	11.27	9.86	10.8	10.3
Regulation of transcription	11.06	9.70	10.6	10.1
Splice variant	18.42	18.35	18.0	18.2
Transcription	11.66	10.24	11.4	10.9
Transferase activity	9.00	8.34	9.1	8.4
Transition metal-ion binding	12.30	11.90	12.3	12.2
Ubiquitin cycle	3.14	3.11	4.2	4.7
Ubiquitin ligase complex	1.45	1.67	2.0	2.4
Ubiquitin–protein ligase activity	1.90	2.05	2.6	3.3
Ubl conjugation pathway	0.42	0.61	2.8	2.9
Vesicle-mediated transport	2.11	1.97	2.6	2.5
Zinc ion binding	10.52	10.01	10.4	10.6
Zinc finger	8.09	8.04	8.4	8.9
Cytoplasm	18.91	15.69	18.1	18.6
Endoplasmic reticulum	2.32	3.11	3.4	3.7
Golgi apparatus	2.78	3.71	3.7	3.5
Intracellular membrane-bound organelle	31.28	25.85	29.0	29.3
Intracellular organelle	35.15	28.28	31.6	32.0
Nuclear protein	18.26	14.56	15.8	15.9
Nucleus	21.57	17.21	18.8	19.1
Organelle	35.16	28.28	31.6	32.0
Organelle membrane	2.64	2.43	2.6	2.6

TABLE 3: mRNAs associated with both Stau1⁵⁵-HA (this study) and FMRP (Brown et al., 2001)

Stau1 ⁵⁵ -HA/FMRP-associated mRNAs	HG_U133	MG_U74v2
Adenylate cyclase 1 (brain)	213245_at	16691_AT
AP1 gamma subunit binding protein 1	239678_at	133560_AT
AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	225486_at	103079_AT
ATM/ATR-substrate Chk2-interacting Zn ²⁺ finger protein	201854_s_at	130730_F_AT
ATPase, Class VI, type 11A	230875_s_at	103899_AT
Cdk5 and Abl enzyme substrate 1	225531_at	117085_AT
Chromosome 15 open reading frame 39	215087_at	104389_AT
Chromosome 6 open reading frame 107	226135_at	103773_AT
Chromosome 9 open reading frame 10	1555908_at	91488_AT
Chondroitin polymerizing factor	202175_at	97387_AT
DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (<i>Drosophila</i>)	1552677_a_at	114468_AT
Dipeptidyl-peptidase 9	230018_at	114469_AT
Dymeclin	223171_at	99988_AT
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	243149_at	96850_AT
Exostosins (multiple)-like 1	206329_at	115969_AT
Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	229394_s_at	96208_AT
Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 1	221737_at	97226_AT
Hypothetical protein DKFZp76112123	54970_at	102271_AT
Jun D proto-oncogene	203752_s_at	1022364_AT
Kelch-like 21 (<i>Drosophila</i>)	203068_at	104293_AT
KIAA0226	212735_at	111540_AT
KIAA0284	213242_x_at	131216_F_AT
KIAA0317	202128_at	109944_AT
KIAA0515	212069_s_at	107033_AT
Latrophilin 1	219145_at	112497_AT
Leucine-rich repeat neuronal 6A	227933_at	139527_AT
MCM3 minichromosome maintenance deficient 3	212269_s_at	97433_AT
Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1	205330_at	110774_AT
Nischarin	227392_at	94236_AT
Nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	226895_at	92241_AT
PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase	212719_at	109399_AT
Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide	207081_s_at	104208_AT
Protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B	225124_at	112345_AT
PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog	200000_s_at	98574_AT
RAB6 interacting protein 1	212561_at	104108_AT
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	20050_at	100530_AT
SET domain containing 1B	213153_at	129315_AT
Spectrin domain with coiled-coils 1	240765_at	102942_AT
Steril alpha motif domain containing 4B	227511_at	100889_AT
Synaptotagmin IX	1563658_a_at	107392_AT
TBC1 domain family, member 16	228488_at	110258_AT
TBC1 domain family, member 24	227908_at	97710_F_AT
Transmembrane protein 1	1555446_s_at	104202_AT
Tyrosine kinase, nonreceptor, 2	2033839_s_at	102850_AT
Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	212760_at	111342_AT
Ubiquitin-specific peptidase 2	229337_at	92820_AT
Unc-51-like kinase 1 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	209333_at	102332_AT
WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	204022_at	103717_AT
WW, C2, and coiled-coil domain containing 1	241950_at	96518_AT
Zinc finger protein 236	222227_at	115194_AT
Zinc finger protein 42 (Myeloid-specific retinoic acid receptor)	40569_at	94101_AT
ZKD family zinc finger C	230209_at	117039_AT

Supplemental material can be found online at www.rnajournal.org.

ARTICLE 2: Stau1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

MISE EN CONTEXTE

Stau1 possède de nombreux rôles dans le métabolisme de l'ARN, tels la localisation, la dégradation et la traduction. Au niveau neuronal, elle est responsable de la localisation dendritique de certains ARNm. Un phénomène possiblement impliqué dans la plasticité synaptique. Afin de déterminer si Stau1 joue un rôle dans la fonction synaptique, nous avons procédé à des études d'électrophysiologie lors de la sous-expression neuronale de celle-ci. En effet, la sous-expression de Stau1 abolie la forme tardive de la potentialisation à long terme, L-LTP, de même que l'amplitude et la fréquence des mEPSC. Au niveau cellulaire, la sous-expression de Stau1 modifie la morphologie des épines, les faisant passer d'une forme mature à une forme immature. Ainsi, il est intéressant de suggérer que Stau1 est important dans le métabolisme d'ARNm responsable de la plasticité synaptique et de la morphologie des épines.

Cet article a été publié en mai 2008 dans *molecular and cellular biology* aux pages 2896-2907

Contribution(s) des auteurs :

LG : immuno/microscopie confocale, enregistrements électrophysiologiques en tranches et analyse, écriture du manuscrit

MML : immunobuvardage de type western, culture de cellules HEK293 et neurone, validation des siRNA, microscopie confocale

TL : enregistrements électrophysiologiques des mEPSC et analyse

LCE : microscopie confocale des épines

SW : supervision générale et écriture du manuscrit

DL : supervision générale et écriture du manuscrit

LJC : supervision générale et écriture du manuscrit

Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

Geneviève Lebeau¹, Marjolaine Maher-Laporte², Lisa Topolnik^{1,3}, Charles E. Laurent¹,
Wayne Sossin⁴, Luc DesGroseillers² and Jean-Claude Lacaille^{1*}.

¹Départements de physiologie, et ²biochimie, GRSNC, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7, and ⁴Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada.

³Current address : Départements de biochimie et microbiologie, Division de Neurobiologie Cellulaire, Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec, G1J 2G3, Canada

Corresponding author:

Dr. Jean-Claude Lacaille

Département de physiologie, Université de Montréal

C.P. 6128 Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Tel.: 514-343-5794

Fax: 514-343-2111

E-mail: 

Running title: Stau1 in synaptic plasticity and spine morphology

Key words: Staufen, late LTP, dendritic spine, miniature EPSC, RNA interference, CA1 hippocampus, slice cultures

Words: Materials and Methods (1273), Introduction, Results and Discussion (4275).

ABSTRACT

Staufen1 is an RNA-binding protein involved in transport, localization, decay and translational control of mRNA. In neurons, it is present in cell bodies and also in RNA granules which are transported along dendrites. Dendritic mRNA localization might be involved in long-term synaptic plasticity and memory. To determine the role of Stau1 in synaptic function, we examined the effects of Stau1 down-regulation in hippocampal slice cultures using siRNA. Biolistic transfection of Stau1 siRNA resulted in selective down-regulation of Stau1 in slice cultures. Consistent with a role of Stau1 in transporting mRNAs required for synaptic plasticity, Stau1 down-regulation impaired the late form of chemically-induced long-term potentiation (L-LTP) without affecting early-LTP, mGluR1/5-mediated long-term depression or basal evoked synaptic transmission. Stau1 down-regulation decreased the amplitude and frequency of mEPSCs suggesting a role in maintaining efficacy at hippocampal synapses. At the cellular level, Stau1 down-regulation shifted spine shape from regular to elongated spines, without changes in spine density. The change in spine shape could be rescued by an RNAi resistant Stau1 isoform. Therefore, Stau1 is important for processing and/or transporting in dendrites mRNAs that are critical in regulation of synaptic strength and maintenance of functional connectivity changes underlying hippocampal-dependent learning and memory.

INTRODUCTION

Staufen is a double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein that was first characterized in *Drosophila*, where it is involved in transport and localization of *bicoid* and *oskar* mRNAs in oocytes, and contributes to localization of *prospero* mRNA during neuroblast development (St Johnston 1995; Broadus, Fuerstenberg et al. 1998; Matsuzaki, Ohshiro et al. 1998). In mammals, two different homologues (Stau1 and Stau2) have been identified (DesGroseillers and Lemieux 1996; Buchner, Bassi et al. 1999). Stau1 is ubiquitously expressed in mammals (Marion, Fortes et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002). Whereas Stau2 is found in several tissues, it is nevertheless mainly expressed in the brain (Marion, Fortes et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002). In neurites, the two paralogues of Staufen are found in distinct RNA granules, suggesting unique functions for each protein (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Thomas, Martinez Tosar et al. 2005). A role for Staufen proteins in mRNA transport and translational control has been proposed since they are present in RNA granules that migrate within the dendrites of hippocampal neurons in a microtubule-dependent way (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Kohrmann, Luo et al. 1999; Krichevsky and Kosik 2001) and regulate transport of mRNA (Tang, Meulemans et al. 2001; Kanai, Dohmae et al. 2004). Staufen proteins also associated with polysomes (Marion, Fortes et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Luo, Duchaine et al. 2002), and Stau1 was shown to be involved in the translational control of mRNAs (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005). Recently, Stau1 was shown to be involved in a specific mRNA decay pathway (Kim, Furic et al. 2005), suggesting an additional role in posttranscriptional gene control.

Localization of mRNA in neuronal dendrites has been proposed as a mechanism for establishing synaptic memory and maintaining synaptic plasticity (Kiebler and DesGroseillers 2000; Sutton and Schuman 2006). There is considerable evidence for local

translation in neuronal dendrites (Tiedge and Brosius 1996; Pierce, van Leyen et al. 2000; Tang and Schuman 2002), and local translation is required for various forms of synaptic plasticity, including the late phase of transcription-dependent LTP, beta-adrenergic-dependent LTP, and mGluR-induced LTD (Huber, Kayser et al. 2000; Bradshaw, Emptage et al. 2003; Gelinias and Nguyen 2005). Local synthesis is also important for the growth and maturation of dendritic spines (Tiedge and Brosius 1996; Ostroff, Fiala et al. 2002; Tang and Schuman 2002; Antar, Afroz et al. 2004). Interestingly, it was also shown that down-regulation of Stau1 by siRNA reduces CaMKII mRNA transport in cultured hippocampal neurons (Kanai et al., 2004). However, the physiological consequences of Stau1 knockdown have not been examined.

In the present study we use RNA interference technique (siRNA) combined with electrophysiological recordings in slice cultures to examine the role of Stau1 in synaptic plasticity. We find an important role for Stau1 specifically in late-LTP. Moreover, knockdown of Stau1 also revealed deficits in spine morphology and spontaneous miniature synaptic activity.

RESULTS

Down-regulation of Stau1 by siRNA transfection

To determine that siRNA can be used for a selective knockdown of Stau1, we tested the efficacy and specificity of the siRNA targeting Stau1 (siRNA-STAU1) by Western blot analysis in human embryonic kidney cells (HEK293), hippocampal neurons in cultures and in hippocampal slice cultures. First, HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for mStau1-HA and hnRNPH1-myc (used as control) and either a non-targeting siRNA (siRNA-CTL) or a siRNA directed against Stau1 (siRNA-STAU1) (Fig. 1A, B). Western blot analyses with anti-HA and anti-myc antibodies indicated a significant reduction in the amounts of Stau1-HA relative to hnRNPH1-myc ($90.0 \pm 3.9\%$ reduction; $n=3$; $p<0.05$; Student's t-test) when co-transfected with siRNA-STAU1, compared to siRNA-CTL (Fig. 1A). When plasmids coding for Stau2-HA instead of Stau1-HA were transfected in HEK293 cells, no decrease in the expression of the proteins was observed in the presence of siRNA-STAU1 compared to siRNA-CTL (Fig. 1B). These results indicate that transfection of siRNA-STAU1 is efficient in down-regulating the expression of Stau1 and the down-regulation is specific, leaving Stau2 levels intact. Next, we tested the efficacy of siRNA-STAU1 transfection to down-regulate endogenous Stau1. Hippocampal neurons in cultures were transfected with either siRNA-CTL or siRNA-STAU1 along with a plasmid coding for ECFP as a marker for transfected cells. Immunofluorescence studies using anti-Stau1 antibody were then performed to evaluate Stau1 expression in individual neurons. An important decrease in Stau1 signal was observed in neurons transfected with siRNA-STAU1 compared to untransfected cells in the same culture (Fig. 1C). In contrast, no decrease was seen in neurons transfected with the siRNA-CTL (Fig. 1C). Then, we determined whether the knockdown expression of Stau1 impairs global mRNA transport in dendrites. Cultured neurons were transfected with siRNA-STAU1 along with a plasmid coding for ECFP as a marker for transfected cells. Neurons were labelled with Syto14, a

dye that stains RNA, and visualized on a confocal microscope. Comparison of siRNA-STAU1 transfected cells, siRNA-CTL transfected cells (data not shown) and surrounding untransfected cells showed no difference in the global staining of RNA in dendrites (Fig 1D). Therefore, although knockdown expression of Stau1 was shown to impair the dendritic transport of a transcript containing the 3'UTR of α CaMKII (Kanai, Dohmae et al. 2004), it does not prevent the overall transport of mRNA in dendrites suggesting that Stau1 inhibits specific mRNA targets.

Then, Stau1 knockdown was tested in hippocampal slice cultures that were biolistically transfected at 4 d in vitro with plasmids coding for EYFP and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Two days post-transfection, slices were homogenized and proteins analyzed by western blotting using anti-Stau1 antibodies (Fig. 2A). Anti-calnexin antibodies were used as a loading control. Transfection of siRNA-STAU1 caused a significant reduction in the expression level of endogenous Stau1 (Fig. 2A) but not of endogenous Stau2 (Fig. 2B) in slice cultures. The neuronal integrity of transfected slice cultures was verified using NeuN immunolabelling and the transfection procedure did not lead to cell loss (Fig. 2C). The knockdown in expression of endogenous Stau1 in organotypic hippocampal slice cultures was more variable than observed with overexpression of tagged-Stau1 in HEK293 cells ranging from 70% reduction to almost no reduction (average of $31.7 \pm 10.5\%$ n=6, 2 independent experiments; $p < 0.05$; Student's t-test). This variability probably reflects the reduced efficiency of transfection in hippocampal slice cultures. To examine this more carefully, we measured the delivery and localization of siRNA in CA1 pyramidal cells in slices using a cyanine3-tagged control siRNA (Cy3-siRNA-CTL) and confocal microscopy (n=6-9; 2 experiments; Fig. 2D, E). We observed that the biolistic transfection mostly occurs at superficial levels of the slice since we found a strong signal in the majority of superficial neurons and a clear gradient of the Cy3-siRNA-CTL from the surface of the slice through deeper levels (z axis). Thus there was only an efficient delivery/transfection in the first 20 to 50 μ m tissue in the slices presumably resulting in specific knockdown of STAU1 only in more superficial neurons,

that fortuitously are the same as those recorded in electrophysiology experiments (next section). Since the entire slices were taken for western blot experiments, the results from this analysis underestimate the knockdown in the neurons recorded in field recording experiments. Taken together, these experiments demonstrate the efficacy and specificity of Stau1 siRNA transfection in down-regulating Stau1 expression in cultured slices.

Stau1 down-regulation impairs specifically late LTP

Local translation of mRNAs in dendrites is known to play an important role in synaptic plasticity (Kiebler and DesGroseillers 2000; Steward and Schuman 2001). Stau1 is a putative candidate protein that may be involved in the regulation of synaptic plasticity since it has been implicated in mRNA trafficking to neuronal dendrites (Kanai, Dohmae et al. 2004; Kim and Kim 2006) and in translational regulation (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005). Therefore, we examined the effect of Stau1 down-regulation on long-lasting changes in synaptic plasticity that requires transcription and translation (Nguyen, Abel et al. 1994; Kelleher, Govindarajan et al. 2004; Kopec, Li et al. 2006). Since standard electrical stimulation protocol (four tetanic trains) for inducing the late form of LTP in acute slices does not reliably induce late-LTP in slice cultures (Kopec, Li et al. 2006), and to maximize the number of synapses that undergo plasticity, LTP was induced chemically, using forskolin (FSK) (Otmakhov, Khibnik et al. 2004; Kopec, Li et al. 2006). FSK elevates cAMP concentrations by activating adenylate cyclase (Chavez-Noriega and Stevens 1992; Huang, Li et al. 1994; Wong, Athos et al. 1999) and elicits spontaneous activity in slice cultures that induce NMDA receptor dependent late LTP (Otmakhov, Khibnik et al. 2004; Kopec, Li et al. 2006). Hippocampal slices were biolistically transfected with plasmid coding for EYFP or co-transfected with EYFP plasmid and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in area CA1 of the hippocampus. In control conditions, application of FSK induced a potentiation of fEPSPs

lasting at least 3.5 hours ($142 \pm 14.5\%$ of control for EYFP and $136 \pm 8.8\%$ of control for siRNA-CTL transfections; $n=10$ each; $p<0.05$; Fig. 3A-E). In slices co-transfected with plasmid encoding EYFP and siRNA-STAU1, FSK-induced long-term potentiation was blocked ($106.7 \pm 10.8\%$ of control at 210 min post-FSK, $n=10$; $p>0.05$; Fig. 3A-E). FSK induced similar spontaneous activity in all three conditions, indicating that the block of L-LTP was not due to a failure of FSK to elicit spontaneous activity necessary for LTP induction. To confirm the type of L-LTP induced in our slice culture conditions, we carried out additional control experiments with the NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) and the transcription inhibitor, actinomycin D (Act D). The FSK-induced L-LTP was blocked by actinomycin D and AP5 (Vehicle: $151.35 \pm 11\%$ of control at 180 min post-FSK, $n=5$, $p<0.05$; ActD: $107.17 \pm 17.7\%$, $n=6$, $p>0.05$; AP5: $110 \pm 21\%$, $n=6$, $p>0.05$). Thus, these results complement those obtained in other studies (Otmakhov, Khibnik et al. 2004; Kopec, Li et al. 2006) and show that FSK-induced late-LTP is NMDA receptor- and protein synthesis-dependent, and displays key features of standard electrically-induced L-LTP. To verify that basal evoked synaptic transmission was unaffected by Stau1 down-regulation, we examined the input-output relation and paired-pulse facilitation (PPF) ratio (at interval of 50-150 ms) of fEPSPs. No significant differences were found between slices transfected with plasmid encoding EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 for input-output function ($n=8-12$; $p>0.05$; Fig. 3F) or PPF ($n=10-14$; $p>0.05$; Fig. 3G). These results indicate that Stau1 down-regulation by siRNA prevented late-LTP but did not affect basal evoked synaptic transmission.

We next tested whether Stau1 down-regulation also affects the early phase of LTP (E-LTP). Two protocols were used to induce E-LTP, theta burst (TBS) and high-frequency (HFS) stimulation. TBS generated similar E-LTP of fEPSP slope in slices transfected with EYFP ($131.9 \pm 5.6\%$ of control), siRNA-CTL ($134.9 \pm 8.2\%$ of control), or siRNA-STAU1 ($140.7 \pm 9.7\%$ of control; $n=6-8$; $p>0.05$; Fig. 4A-D). Similar E-LTP results were obtained following HFS of slices transfected with EYFP expressor ($133.6 \pm 9.7\%$ of control), siRNA-CTL ($135.1 \pm 13.1\%$ of control), or siRNA-STAU1 ($136.4 \pm 17.1\%$ of control; $n=4-5$;

$p > 0.05$; Fig. 4F-G). Thus, transfection of siRNA-STAU1 did not impair E-LTP, indicating that Stau1 down-regulation interferes specifically with the induction or expression of L-LTP.

Next, we determined whether long-term depression (LTD) is affected by Stau1 down-regulation. Transient activation of mGluR1/5 by application of the selective agonist DHPG produces a long-term depression of excitatory synaptic responses in CA1 pyramidal cells which requires local translation of dendritic mRNAs in mature neurons, but is translation-independent earlier in development such as in the present experiments (Huber, Sawtell et al. 1998; Fitzjohn, Kingston et al. 1999; Huber, Kayser et al. 2000; Volk, Daly et al. 2006). As expected, application of DHPG (100 μ M, 10 min) induced LTD of fEPSPs in control slice cultures transfected with plasmid coding for EYFP (62.2 \pm 7% of control) or co-transfected with siRNA-CTL (66.7 \pm 7.7% of control; n=10; Fig. 5A,B). Transfection of slice cultures with siRNA-STAU1 did not affect DHPG-induced LTD either (61.3 \pm 2.8% of control, n=10; $p > 0.05$; Fig. 5C-E) indicating that Stau1 down-regulation does not impair translation-independent mGluR-mediated LTD in CA1 hippocampal area.

Stau1 down-regulation reduces miniature synaptic activity

We next tested whether the deficit in late-LTP after Stau1 down-regulation was associated with functional changes at unitary excitatory synapses. We recorded miniature EPSCs (mEPSCs) in EYFP-transfected CA1 pyramidal cells voltage-clamped at -60 mV and examined the effect of siRNA on amplitude and frequency of synaptic activity (Fig. 6A). Given that shRNA transfection can trigger off-target effects which affect passive membrane properties, including membrane capacitance and input resistance (Alvarez, Ridenour et al. 2006), we first determined whether siRNA transfection in our experiments might produce similar off-target actions. The membrane capacitance (c_m) and input resistance (R_{in}) of transfected pyramidal cells were comparable between the three

conditions (EYFP: $R_{in}=193.8\pm33.6$ M Ω and $c_m=18.5\pm2.4$ pF; siRNA-CTL: $R_{in}=185\pm22.8$ M Ω and $c_m=18.6\pm1.3$ pF; siRNA-STAU1: $R_{in}=196.1\pm14.3$ M Ω and $c_m=22.6\pm2.2$ pF; $n=7$, $p>0.05$). The lack of impairment in passive membrane properties after siRNA transfection suggests no such off-target effects of the siRNAs used (Alvarez, Ridenour et al. 2006). In contrast, Stau1 siRNA transfection affected miniature synaptic activity. The cumulative distribution of mEPSC amplitude was significantly decreased in neurons transfected with siRNA-STAU1 relative to neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL ($n=7$ each, 3-5slices, 10 independent experiments, $p<0.05$; Kolmogorov-Smirnov test; Fig. 6B). The median of cumulative histograms for mEPSC amplitudes in neurons transfected with siRNA-STAU1 was significantly different compared to that in neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL (median \pm standard deviation; EYFP: -18.5 ± 10.9 pA; siRNA-CTL: -20.5 ± 10.9 pA; siRNA-STAU1: -11.75 ± 7 pA, $p<0.001$, Fig. 6B). Also, the cumulative distribution of inter-mEPSC interval was significantly increased in neurons transfected with siRNA-STAU1 ($p<0.05$; Kolmogorov-Smirnov test; Fig. 6C). In this case, the median of cumulative histograms for mEPSC inter-event-interval in neurons transfected with siRNA-STAU1 was significantly different relative to that in neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL (EYFP: 0.83 ± 0.8 s; siRNA-CTL: 0.8 ± 0.7 s; siRNA-STAU1: 1.54 ± 1.3 s, $p<0.001$, Fig. 6C). Decreases in mEPSC amplitude are most consistent with postsynaptic modifications of synapses (receptor numbers or sensitivity), whereas decreases in mEPSC frequency are associated with changes in presynaptic transmitter release or in number of functional synapses (Manabe, Renner et al. 1992; Scanziani, Capogna et al. 1992). Thus, the observed effects on miniature synaptic activity suggest that Stau1 down-regulation is associated with both a reduction of postsynaptic efficacy at individual synapses, as well as a decrease in number of functional synapses or changes in presynaptic transmitter release in pyramidal cells.

Stau1 down-regulation induces dendritic spine morphology changes

In hippocampal pyramidal neurons, dendritic spines act as independent cellular compartments enabling selective regulation of individual synapses (Harris and Stevens 1989; Yuste and Denk 1995). Moreover, the morphology and density of dendritic spines reflect the properties and number of synapses (Harris and Stevens 1989; Yuste and Denk 1995). For instance, elongated spines are associated with smaller postsynaptic densities (PSDs) and a higher proportion of silent synapses (Harris and Stevens 1989; Nusser, Lujan et al. 1998; Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001). Therefore, we next examined if changes in unitary synaptic function after *Stau1* down-regulation were associated with changes of spine density and morphology in hippocampal CA1 pyramidal cells. Hippocampal slices were transfected with plasmids coding for EYFP, or co-transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. First, confocal imaging of EYFP-labelled cells indicated no obvious alteration in the general dendritic arborization of transfected cells in any groups (Fig. 7A). Second, the overall spine density was not significantly different in cells transfected with EYFP alone (0.24 ± 0.01 spines/ μm), siRNA-CTL + EYFP (0.25 ± 0.02 spines/ μm) or siRNA-STAU1 + EYFP (0.26 ± 0.02 spines/ μm ; $p > 0.05$; Fig. 7B), indicating no significant loss of spines in cells of any group. However, significant differences were observed at the level of spine morphology. The length of dendritic spines was significantly longer in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP than in cells transfected with EYFP alone ($128.76 \pm 4.38\%$ of control EYFP) or co-transfected with siRNA-CTL + EYFP ($125.65 \pm 4.27\%$ of control siRNA-CTL; $p < 0.05$; $n = 472, 474,$ and 486 protrusions in EYFP, siRNA-CTL + EYFP and siRNA-STAU1 + EYFP groups, respectively; $n = 4-6$ separate experiments) (Fig. 7C). The cumulative distribution of spine lengths was significantly different in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP compared to EYFP alone (Fig. 7C; $p < 0.05$).

To characterize further the changes in spine morphology, we examined changes in different classes of spines categorized on the basis of spine length and shape (McKinney 2005): 1- filopodia, long protrusions ($>1\mu\text{m}$) without a spine head; 2- elongated spines, long protrusions ($>1\mu\text{m}$) with a small head at the tip; and 3- regular spines, short protrusions ($<1\mu\text{m}$) including stubby and mushroom-type spines. Our data showed that in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP, there was a significant increase in the proportion of elongated spines ($137.61\pm 4.58\%$ compared to EYFP alone [EYFP]; $127.80\pm 4.38\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D) and filopodia ($206.11\pm 4.67\%$ compared to EYFP alone [EYFP]; $185.03\pm 4.65\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D), and a significant reduction in regular spines ($43.54\pm 6.35\%$ compared to EYFP alone [EYFP] $48.13\pm 7.02\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D).

As an additional control, we repeated this experiment using a second interfering RNA (sh1) that targets a different Stau1 sequence. In addition, to confirm that the observed phenotype is the result of Stau1 down-regulation and not off-target effects, we expressed a Stau1 isoform that is not recognized by the shRNA (Stau1⁵⁵ Δ sh1) and determined whether this could rescue the phenotype. Spine density was unchanged in shRNA-CTL (0.26 ± 0.02 spines/ μm), shRNA-STAU1/sh1 (0.31 ± 0.03 spines/ μm) or shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 (0.29 ± 0.02 spines/ μm ; $p > 0.05$; Fig. 8B) transfected cells. However, spine length was significantly increased in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 relative to cells transfected with shRNA-CTL ($113.45\pm 2.48\%$) or to cells co-transfected with shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 ($117.22\pm 2.56\%$) ($p < 0.05$; $n=487$, 592 and 605 protrusions in shRNA-CTL, shRNA-STAU1/sh1 and shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 groups, respectively; $n=4-6$ separate experiments; Fig. 8C). There was no significant difference between cells transfected with shRNA-CTL ($1.18\pm 0.04\mu\text{m}$) and shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 ($1.21\pm 0.03\mu\text{m}$) indicating that expression of Stau1⁵⁵ Δ sh1 could rescue the effects of the shRNA-STAU1/sh1.

As shown in figure 8D, in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 there was a significant increase in the proportion of elongated spines to $131.68 \pm 5.50\%$ relative to cells transfected with shRNA-CTL. Co-transfection of Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 rescued the phenotype; the percentage of elongated spines in shRNA-STAU1/sh1 transfected cells was $147.02 \pm 6.14\%$ relative to cells co-transfected with Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 ($p < 0.05$; Fig. 8D). Similarly for regular spines, in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 there was a significant decrease in their proportion to $65.40 \pm 4.99\%$ relative to cells transfected with shRNA-CTL. Again, co-transfection of Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 rescued the phenotype and the percentage of regular spines in shRNA-STAU1/sh1 transfected cells was $61.88 \pm 4.73\%$ relative to cells co-transfected with Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 ($p < 0.05$; Fig. 8D). There was no significant difference in the proportion of filopodia between the three conditions (shRNA-CTL $10.56 \pm 1.51\%$; shRNA-STAU1/sh1 $10.66 \pm 1.34\%$; shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 $9.02 \pm 1.13\%$; $p > 0.05$; Fig. 8D). Thus, transfection with shRNA-STAU1/sh1 resulted generally in similar effects as transfection with siRNA-STAU1, except for the unchanged proportion of filopodia. It is possible that the sh1 interfering RNA endogenously produced from a plasmid following transfection is less effective to down-regulate Stau1 expression than the siRNA. It may also explain the reduced phenotype in spine length observed with Stau1 shRNA as compared to Stau1 siRNA. Overall, this series of results indicate that the increase in spine length after transfection of Stau1 siRNA was due to a shift in spine shape from regular to elongated and filopodia types of spines. Thus, Stau1 down-regulation results in impairment of mature dendritic spine morphology.

DISCUSSION

Our principal findings are that Stau1 siRNA transfection results in selective down-regulation of Stau1 in hippocampal slice cultures, blocks specifically late phase LTP without affecting early phase LTP or LTD at pyramidal cell synapses, reduces spontaneous miniature synaptic activity and alters morphology of mature dendritic spines of pyramidal cells. Our findings provide evidence for a key role for Stau1 in long-term plasticity and maintenance of mature synaptic connections in hippocampal neurons.

Expression of shRNAs and siRNAs can potentially trigger severe morphological and functional perturbations in neurons via off-target actions (Sledz, Holko et al. 2003; Judge, Sood et al. 2005; Alvarez, Ridenour et al. 2006). Therefore, we performed several control experiments to validate our experimental approach of transfection in slice cultures. First, we confirmed with NeuN staining the absence of general morphological changes in hippocampal organization in slice cultures. Also, using confocal microscopy and imaging of individual EYFP-labelled cells, we found that dendritic arborisations of pyramidal neurons were unaffected by RNAi transfection (Alvarez, Ridenour et al. 2006). Moreover, spine density was similar in all conditions and spine loss did not occur (Alvarez, Ridenour et al. 2006). Most importantly, we were able to rescue the phenotype of spine length and shape changes associated with Stau1 down-regulation by co-expression of a Stau1 isoform (Stau1⁵⁵Δsh1) not targeted by the Stau1 shRNA. Finally, input resistance and membrane capacitance, passive membrane properties that are affected by off-target actions (Alvarez, Ridenour et al. 2006), were unchanged in neurons transfected with siRNA. Hence, these results strongly indicate that down-regulation of the targeted protein Stau1, and not off-target actions, are responsible for the changes observed in this study.

Role of Stau1 in long-term synaptic plasticity

The late form of LTP is dependent on transcriptional and translational mechanisms (Frey, Krug et al. 1988; Nguyen, Abel et al. 1994). Inhibition of de novo transcription impairs this late LTP, without affecting the early form of LTP that requires post-translational modification of pre-existing proteins. Some of the transcripts generated during induction of L-LTP require local translation since focal dendritic application of protein synthesis inhibitors in slices inhibits L-LTP (Bradshaw, Emptage et al. 2003). Moreover, Ostroff et al. (2002) have demonstrated the presence of polyribosome in dendritic spines, suggesting that local translation of new proteins may be enhanced at activated synaptic sites after LTP induction. Consistent with the established role of Stau1 in RNA transport (Tang, Meulemans et al. 2001; Kanai, Dohmae et al. 2004; Kim and Kim 2006), the impairment of L-LTP observed after Stau1 down-regulation is likely due to impaired transport of newly synthesized mRNAs. While we cannot rule out that other deficits in synaptic function seen after Stau1 down-regulation (changes in miniature synaptic activity and spine morphology) could also contribute to deficits in late-LTP, we think this is unlikely for a number of reasons. First basal evoked synaptic transmission, assessed by input-output curves and paired-pulse facilitation of fEPSPs, was unchanged after Stau1 siRNA transfection. Second, early-LTP and mGluR1/5-dependent LTD were not affected, suggesting that synapses and spines are intact and still capable of undergoing bi-directional plasticity. Third, the use of chemical LTP (Kopec, Li et al. 2006) obviates the possibility that a lack of sufficient synaptic drive during the induction protocol could explain the lack of late LTP. Thus, we believe that the most parsimonious explanation is that impairment in late-LTP is due to the lack of transport and/or local translation of newly synthesized mRNAs.

There are additional correlative studies suggesting a role for RNA transport in late forms of synaptic plasticity and memory. In *Drosophila*, removal of Staufen reduces memory formation (Dubnau, Chiang et al. 2003), although the mechanism of synaptic

plasticity involved in this memory has not been established. Interestingly, Miller et al. (2002) showed that removal of the native 3'UTR of α CaMKII mRNA in mutant mice prevented dendritic localization of α CaMKII mRNA and decreased levels of α CaMKII in dendrites, as well as reducing late-LTP. Since Stau1 has been previously implicated in the transport of α CaMKII mRNA (Kanai, Dohmae et al. 2004), our results would be consistent with a requirement for translation of α CaMKII for late-LTP. However, since in this particular study (Miller, Yasuda et al. 2002), levels of α CaMKII in dendrites were severely decreased before stimulation, it is unclear whether the deficit in long-term memory was due to the acute lack of translation of α CaMKII after tetanization.

Role of Stau1 in spine morphogenesis and spontaneous miniature synaptic activity

Dendritic spines are thought to act as functional units, providing microcompartments for segregating postsynaptic chemical responses, such as calcium elevation (Yuste and Denk 1995; Sabatini, Maravall et al. 2001), and for integrating synaptic signals. The significant increase in the percentage of elongated spines and filopodia-like protrusions after Stau1 down-regulation, suggests a close relationship between Stau1 and dendritic spine morphology. The size of the spine head is proportional to the post-synaptic densities (PSD), the number of postsynaptic α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors (Nusser, Lujan et al. 1998; Shi, Hayashi et al. 1999; Turrigiano 2000), suggesting that growth of the spine head correlates with strengthening of the synapse. Moreover, elongated spines and filopodia-like protrusions have been shown to be postsynaptic components of silent synapses (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001). Therefore, an increase in elongated spines and filopodia-like protrusions after Stau1 down-regulation could possibly reflect a down-regulation of synaptic function. This is consistent with the decrease in miniature EPSC frequency and

amplitude seen in this study. Interestingly, in several studies on Fragile X syndrome (Comery, Harris et al. 1997; Greenough, Klintsova et al. 2001; Zalfa, Achsel et al. 2006), the marked increase in the proportion of elongated spines and filopodia-like protrusions, is similar to the effect observed with Stau1 down-regulation. Stau1 and FMRP may have similar functions in regulating RNA transport and/or translation.

Staufen isoforms and functional implications

Another important finding is that the alterations of spine morphology observed with Stau1 down-regulation have clear correlated functional consequences. We found a reduction in amplitude and frequency of spontaneous miniature synaptic activity that is consistent with the observed reduction in the number of regular spines and hypothesized increase in number of silent synapses (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001). Thus Stau1 appears to be involved in the maintenance of mature spine morphology and excitatory synaptic activity. Interestingly, basal evoked synaptic transmission, assessed by fEPSP input-output curves, paired-pulse facilitation, early-LTP and mGluR1/5 LTD induction, were unchanged after siRNA transfection, suggesting that other parallel changes, likely involving inhibitory synaptic function, also take place after Stau1 down-regulation, which result in normal levels of excitability in hippocampal networks.

A recent study suggests that the other Staufen paralogue, Stau2, has an important role in the formation and maintenance of synapses and dendritic spines in cultured hippocampal neurons (Goetze, Tuebing et al. 2006). After Stau2 down-regulation, a significant reduction in the number of dendritic spines and an increase in filopodia-like protrusions were noted. Also, the number of PSD-95 positive synapses and mEPSC amplitude were markedly reduced. The differences observed after Stau2 down-regulation and those reported here suggest that both paralogues may have distinct, but related functions. Notably, the observed reduction in spine density after Stau2 down-regulation

indicates that this isoform is involved in synapse formation and spine morphogenesis (Goetze, Tuebing et al. 2006), while we observe no decreases in the number of spines, suggesting that Stau1 is more involved in synaptic plasticity and associated spine morphology changes. Interestingly, no decrease was observed in mEPSC frequency after Stau2 down-regulation in cultured neurons. It is possible that the environment of cultured neurons may be less permissive for the formation of silent synapses than in hippocampal slice cultures, and thus difference in model systems may explain the lack of change in mEPSC frequency. Alternatively, the decrease in mEPSC frequency observed after Stau1 down-regulation may be related with the deficit in late-LTP which was also present. Stau1 and Stau2 do not co-localize with each other in distal dendrites, suggesting that these proteins are located in distinct RNA granules (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Stau1 is known to participate in translational control, consistent with our data for distinct roles of Stau1 and Stau2 in the formation of synapses and spines during development (Goetze, Tuebing et al. 2006). This suggests that different transport mechanisms are used for different pools of mRNAs, which is also supported by the multiple classes of RNA transport particles and granules identified in neurons (Elvira, Massie et al. 2006; Sossin and DesGroseillers 2006).

Our findings with Stau1 shed some light on the importance of mRNA transport to dendrites for regulating synaptic function and long-term plasticity. It will be interesting to examine how Staufen paralogues are associated with RNA granules and whether different RNA granules containing Stau1 and Stau2 transport different sets of mRNA. These are important questions to understand further the role of RNA-binding proteins and mRNA trafficking in synaptic plasticity and associated functional connectivity changes underlying hippocampal-dependent learning and memory.

MATERIALS AND METHODS

Organotypic hippocampal slice cultures

All experiments were done in accordance with animal care guidelines at Université de Montréal. Organotypic hippocampal slices were prepared and maintained in culture as previously described (Stoppini, Buchs et al. 1991). In brief, Sprague-Dawley rats (postnatal day 7) were anaesthetised and decapitated. The brain was removed and dissected in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen Canada, ON) based medium. Cortico-hippocampal slices (400 µm thick) were obtained with a McIlwain tissue chopper (Campden Instruments, IN). Slices were placed on Millicell culture plate inserts (Millipore, MA) and incubated for 3 days in OptiMem (Invitrogen Canada, ON) based medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Inserts were then transferred to Neurobasal based medium (Invitrogen Canada, ON). Slices were used for experiments after 4-7 days in culture.

HEK293 cells

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Life Science), supplemented with 10% Cosmic calf serum (Hyclone, Logan, UT), 5 µg/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen Life Science) and maintained at 37°C saturated with in 5% CO₂.

siRNAs and transfections

ECFP (Clontech Laboratories, CA) was cloned into the pCDNA-RSV vector. pEYFP-C1 (EYFP) was obtained from Clontech Laboratories (CA). All siRNAs were purchased from Dharmacon (CO). Commercial siCONTROL™ was used as non-targeting control siRNA. siRNA-STAU1 target sequences for rat were 5'-GGACAGCAGUUUAAUGGGGAUU-3' (sense sequence) and 5'-PUCCCAUUAAACUGCUGUCCUU-3' (antisense sequence). shRNA-STAU1/sh1 and plasmid coding for Stau1⁵⁵Δsh1 were described previously (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005). HEK293 cells were seeded at 2×10^5 in a 6 wells plate and transfected with 60 μmol of either siRNA-CTL, or siRNA-STAU1 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Science). 24 hours post-transfection, cells were transfected again with 100 μmol of the respective siRNA and 1 μg each of plasmids coding for Stau1-HA or Stau-2-HA and hnRNP1-myc, used as control. Cells were processed for western blotting 24 hours post-transfection. Biolistic transfection of neurons in organotypic slice cultures was made as previously described (Bourdeau, Morin et al. 2007), using a Helios gene gun (Bio-Rad, CA) following manufacturer's instructions. Biolistic transfection of cyanine3-tagged non targeting siRNA (Cy3-siRNA-CTL) and confocal microscopy following fixation of slice cultures were used to verify siRNA delivery in pyramidal cells. Electrophysiological recordings and cell imaging experiments were performed 48 hours after transfection and the experimenter was blind to transfection treatments.

Electrophysiology

Individual slice cultures were transferred to a submerged recording chamber and continuously perfused (at 1-2 ml/min) with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 dextrose, 2.5

CaCl₂, (5KCl, 2 MgSO₄ and 2 CaCl₂ for LTD experiments), saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4. Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded from CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode (2-3 MΩ) filled with 2M NaCl in slices maintained at 25-27°C. A bipolar tungsten electrode placed in stratum radiatum was used for electrical stimulation of Schaffer collaterals. Stimulus intensity (0.1 ms duration) was adjusted to elicit 30-40% of the maximal fEPSP, as determined by an input-output curve for each slice (LTD, 60% of maximal). To reduce spontaneous activity, CA1 and CA3 hippocampal regions were isolated by a surgical cut. The late form of long-term potentiation (L-LTP) was induced chemically by the adenylyate cyclase activator forskolin (FSK, 50 μM, Sigma) (Kelleher, Govindarajan et al. 2004; Kopec, Li et al. 2006). The early phase of LTP was induced using either high-frequency stimulation (100 pulses at 100 Hz applied twice with at 5 min interval) or theta burst stimulation (four pulses at 100 Hz per burst, five bursts at 5 Hz per train) applied twice at 10s intervals. Long-term depression (LTD) was induced chemically by the group I metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist (*S*)-3, 5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, 100 μM, Tocris). Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in whole-cell patch-clamp mode from EYFP-transfected CA1 pyramidal cells using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in slices maintained at 27-32°C. Recording pipettes (4-5 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 130 CsMeSO₃, 5 CsCl, 2 MgCl₂, 5 diNa-phosphocreatine, 10 HEPES, 2 ATPTris, and 0.4 GTPTris, pH 7.2–7.3, 275-285 mOsm. Bicuculline (Bic; 10 μM) and tetrodotoxin (TTX; 0.5 μM) were added to the extracellular solution, and cells were voltage clamped at -60 mV. Data acquisition (filtered at 2 KHz, digitized at 10 kHz) and analysis were performed using a PC equipped with pClamp9 software (Molecular Devices). Threshold mEPSC amplitude was set at 3 pA, and typically 150-250 events were collected over a 10-20 minute period.

Immunocytochemistry

Rat primary hippocampal neurons were dissected from E17-E19 Sprague Dawley embryos (Charles River Laboratories) and cultured as described (Banker and Goslin 1988; Elvira, Massie et al. 2006). Briefly, neurons were plated at 80 000 cells/ml on 18-mm diameter glass coverslips (Fisher Scientific) coated with 0.1% poly-D-lysine. Transfections of 20pmol of siRNA and 0,3 µg of plasmid coding for ECFP were performed with 2µl of lipofectamine-2000 reagent (Invitrogen). 48 hours post-transfection, neurons were fixed with 4% paraformaldehyde/ 4% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min. Neurons were then permeabilized with 0.3% Triton X-100/ 2% BSA in PBS for 10min, blocked with 0.1% Triton X-100/ 2% BSA in PBS for 45 min and further washed with the same solution. Neurons were incubated with 2 µg/ml mouse anti-CFP (Roche) and rabbit anti-Staufen1 (1:100) (Wickham, Duchaine et al. 1999) antibodies for 1h, washed and stained with Alexa Fluor 488 dye anti-mouse IgG or Alexa Fluor 594 dye anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes) for 1h. Following the immuno-labeling procedure, some neuron cultures (as indicated) were incubated with 10 µM of Syto14 (Invitrogen S7576) for 15 min. Coverslips were mounted on slides (Fisher) using Dako fluorescent mounting medium (Dako). Neurons were visualized under an Olympus fv300 confocal microscope using an uplfl 60x1.40 NA oil immersion objective lens. Hippocampal slices were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 phosphate buffer (PB, 4°C, overnight). Slices were cryoprotected in 30% sucrose and recut (60 µm-thick) on a freezing microtome (Leica SM2000R, Germany). Sections were treated with 0.3% H₂O₂ (30 min), preincubated with 2% normal goat serum (NGS) and 0.2% Triton X-100 in 0.1M PBS for 2h at room temperature (RT) and then incubated with primary mouse monoclonal NeuN antibody (1:250, overnight, RT, Chemicon, CA). The next day, sections were placed in biotinylated secondary goat anti-mouse IgG antibody (1:500, 2h, RT, Vector Laboratories). Sections were then re-incubated in the avidin-biotin complex (Elite ABC kit; Vector Laboratories, 1:200, 2h) and visualized

using 3, 3'-diaminobenzidine. Sections were rinsed thoroughly between incubations and mounted in DPX.

Western Blotting

Protein samples from hippocampal slice or HEK extract were separated on a 10% SDS polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE) and transferred on to Amersham Hybond™-P (PVDF) membrane. Immunoblots were performed in PBS/0.2% tween-20 with specific antibodies.

Imaging and morphological analysis

Slices were fixed with 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, washed in phosphate buffer and mounted on slides for confocal microscopy. EYFP-transfected CA1 pyramidal neurons were randomly selected based on green fluorescence and characteristic morphology. For spine analysis, Z-stacks consisting of 10-20 sections (512 x 512 pixels, 30-100 µm-long dendritic segments) spaced 0.2-0.4 µm apart were collected from the secondary branches of apical dendrites using a confocal laser scanning microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Kirkland QC) equipped with a 63X oil-immersion objective (NA 1.4; Carl Zeiss, Kirkland QC). The length and morphology of dendritic spines was measured using the LSM 510 software. Four to six independent experiments were performed and 1784 protrusions were analyzed from 72 neurons.

Statistical analysis

Baseline synaptic transmission was monitored for 15 min or 30 min (LTP experiments) and 20 min (LTD experiments) before the induction stimulation protocol or drug administration. The slope of fEPSPs was expressed as a percentage of the baseline average before induction or drug application. Every data point represents an average of normalized data in bins of 2-min (early-LTP), 5-min (late-LTP) or 2.5-min (LTD). Statistical differences were compared between baseline values and values after induction or drug application (Student's paired *t*-test). Data are represented as means \pm standard error of the mean (s.e.m), unless otherwise mentioned, and statistical significance was set at $p < 0.05$. Differences between all transfected groups were assessed with ANOVA tests. Comparisons of cumulative distribution of spine length and mEPSC parameters between groups were performed using Kolmogorov-Smirnov tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Julie Pepin for excellent technical assistance.

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Synaptic Transmission and Plasticity Group) and the Canada Research Chair Program (J.-C.L.; Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology). WSS is a William Dawson scholar and FRSQ Chercheur National. G.L and L.T. were supported by Savoy Foundation. MML was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. **Alvarez, V. A., D. A. Ridenour, and B. L. Sabatini.** 2006. Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. *J Neurosci* **26**:7820-5.
2. **Antar, L. N., R. Afroz, J. B. Dichtenberg, R. C. Carroll, and G. J. Bassell.** 2004. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**:2648-55.
3. **Banker, G., and K. Goslin.** 1988. Developments in neuronal cell culture. *Nature* **336**:185-6.
4. **Bourdeau, M. L., F. Morin, C. E. Laurent, M. Azzi, and J. C. Lacaille.** 2007. Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **27**:1942-53.
5. **Bradshaw, K. D., N. J. Emptage, and T. V. Bliss.** 2003. A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci* **18**:3150-2.
6. **Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe.** 1998. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**:792-5.
7. **Buchner, G., M. T. Bassi, G. Andolfi, A. Ballabio, and B. Franco.** 1999. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* **62**:113-8.
8. **Chavez-Noriega, L. E., and C. F. Stevens.** 1992. Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res* **574**:85-92.
9. **Comery, T. A., J. B. Harris, P. J. Willems, B. A. Oostra, S. A. Irwin, I. J. Weiler, and W. T. Greenough.** 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X

- knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5401-4.
10. **DesGroseillers, L., and N. Lemieux.** 1996. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **36**:527-9.
 11. **Dubnau, J., A. S. Chiang, L. Grady, J. Barditch, S. Gossweiler, J. McNeil, P. Smith, F. Buldoc, R. Scott, U. Certa, C. Broger, and T. Tully.** 2003. The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* **13**:286-96.
 12. **Duchaine, T. F., I. Hemraj, L. Furic, A. Deitinghoff, M. A. Kiebler, and L. DesGroseillers.** 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* **115**:3285-95.
 13. **Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers.** 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**:4797-812.
 14. **Elvira, G., B. Massie, and L. DesGroseillers.** 2006. The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* **96**:105-17.
 15. **Fitzjohn, S. M., A. E. Kingston, D. Lodge, and G. L. Collingridge.** 1999. DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology* **38**:1577-83.
 16. **Frey, U., M. Krug, K. G. Reymann, and H. Matthies.** 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* **452**:57-65.
 17. **Gelinas, J. N., and P. V. Nguyen.** 2005. Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* **25**:3294-303.

18. **Goetze, B., F. Tuebing, Y. Xie, M. M. Dorostkar, S. Thomas, U. Pehl, S. Boehm, P. Macchi, and M. A. Kiebler.** 2006. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* **172**:221-31.
19. **Greenough, W. T., A. Y. Klintsova, S. A. Irwin, R. Galvez, K. E. Bates, and I. J. Weiler.** 2001. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7101-6.
20. **Harris, K. M., and J. K. Stevens.** 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* **9**:2982-97.
21. **Huang, Y. Y., X. C. Li, and E. R. Kandel.** 1994. cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* **79**:69-79.
22. **Huber, K. M., M. S. Kayser, and M. F. Bear.** 2000. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* **288**:1254-7.
23. **Huber, K. M., N. B. Sawtell, and M. F. Bear.** 1998. Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex. *J Neurosci* **18**:1-9.
24. **Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, and I. MacLachlan.** 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* **23**:457-62.
25. **Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa.** 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**:513-25.
26. **Kelleher, R. J., 3rd, A. Govindarajan, H. Y. Jung, H. Kang, and S. Tonegawa.** 2004. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **116**:467-79.

27. **Kiebler, M. A., and L. DesGroseillers.** 2000. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**:19-28.
28. **Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin, and C. G. Dotti.** 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**:288-97.
29. **Kim, K. C., and H. K. Kim.** 2006. Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* **397**:48-52.
30. **Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat.** 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**:195-208.
31. **Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler.** 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**:2945-53.
32. **Kopec, C. D., B. Li, W. Wei, J. Boehm, and R. Malinow.** 2006. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* **26**:2000-9.
33. **Krichevsky, A. M., and K. S. Kosik.** 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**:683-96.
34. **Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers.** 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* **365**:817-24.
35. **Manabe, T., P. Renner, and R. A. Nicoll.** 1992. Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**:50-5.

36. **Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin.** 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2212-9.
37. **Matsuzaki, F., T. Ohshiro, H. Ikeshima-Kataoka, and H. Izumi.** 1998. miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* **125**:4089-98.
38. **Matsuzaki, M., G. C. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, and H. Kasai.** 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **4**:1086-92.
39. **McKinney, R. A.** 2005. Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. *Biochem Soc Trans* **33**:1299-302.
40. **Miller, S., M. Yasuda, J. K. Coats, Y. Jones, M. E. Martone, and M. Mayford.** 2002. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* **36**:507-19.
41. **Nguyen, P. V., T. Abel, and E. R. Kandel.** 1994. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* **265**:1104-7.
42. **Nusser, Z., R. Lujan, G. Laube, J. D. Roberts, E. Molnar, and P. Somogyi.** 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* **21**:545-59.
43. **Ostroff, L. E., J. C. Fiala, B. Allwardt, and K. M. Harris.** 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* **35**:535-45.
44. **Otmakhov, N., L. Khibnik, N. Otmakhova, S. Carpenter, S. Riahi, B. Asrican, and J. Lisman.** 2004. Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol* **91**:1955-62.

45. **Pierce, J. P., K. van Leyen, and J. B. McCarthy.** 2000. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci* **3**:311-3.
46. **Sabatini, B. L., M. Maravall, and K. Svoboda.** 2001. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* **11**:349-56.
47. **Scanziani, M., M. Capogna, B. H. Gähwiler, and S. M. Thompson.** 1992. Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* **9**:919-27.
48. **Shi, S. H., Y. Hayashi, R. S. Petralia, S. H. Zaman, R. J. Wenthold, K. Svoboda, and R. Malinow.** 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**:1811-6.
49. **Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**:834-9.
50. **Sossin, W. S., and L. DesGroseillers.** 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**:1581-9.
51. **St Johnston, D.** 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**:161-70.
52. **Steward, O., and E. M. Schuman.** 2001. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**:299-325.
53. **Stoppini, L., P. A. Buchs, and D. Müller.** 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37**:173-82.
54. **Sutton, M. A., and E. M. Schuman.** 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* **127**:49-58.
55. **Tang, S. J., D. Meulemans, L. Vazquez, N. Colaco, and E. Schuman.** 2001. A role for a rat homolog of stau6 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**:463-75.

56. **Tang, S. J., and E. M. Schuman.** 2002. Protein synthesis in the dendrite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**:521-9.
57. **Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio.** 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* **16**:405-20.
58. **Tiedge, H., and J. Brosius.** 1996. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **16**:7171-81.
59. **Turrigiano, G. G.** 2000. AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* **26**:5-8.
60. **Volk, L. J., C. A. Daly, and K. M. Huber.** 2006. Differential roles for group 1 mGluR subtypes in induction and expression of chemically induced hippocampal long-term depression. *J Neurophysiol* **95**:2427-38.
61. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**:2220-30.
62. **Wong, S. T., J. Athos, X. A. Figueroa, V. V. Pineda, M. L. Schaefer, C. C. Chavkin, L. J. Muglia, and D. R. Storm.** 1999. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* **23**:787-98.
63. **Yuste, R., and W. Denk.** 1995. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* **375**:682-4.
64. **Zalfa, F., T. Achsel, and C. Bagni.** 2006. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**:265-9.

FIGURES AND LEGENDS

FIGURE 1: Down-regulation of Stau1 by siRNA in HEK293 cells and in cultured hippocampal neurons.

A, B, HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for hnRNPH1-myc and either mStau1-HA (*A*) or mStau2-HA (*B*) and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Expression of the proteins was monitored by western blotting using anti-HA and anti-myc antibodies and plotted as the percentage of expression of Stau1-HA compared to that of hnRNPH1-myc. Expression of Stau1-HA in cells with siRNA-CTL was set to 100%. Protein expression level (%) of Stau1, but not of Stau2, is significantly down-regulated in cells transfected with siRNA-STAU1. **C**, Immunostaining for Staufen1 in untransfected neurons and in neurons co-expressing ECFP and siRNA-CTL (top) or ECFP and siRNA-STAU1 (bottom). Stau1 expression was decreased in siRNA-STAU1 transfected cells compared to untransfected cells. Scale bar, 50 μm . **D**, Syto14 labelling in untransfected neurons and in neurons co-expressing ECFP and siRNA-STAU1. Stau1 down-regulation does not prevent the overall transport of mRNA in dendrites suggesting that Stau1 inhibits specific mRNA targets. Scale bar, 50 μm .

FIGURE 1

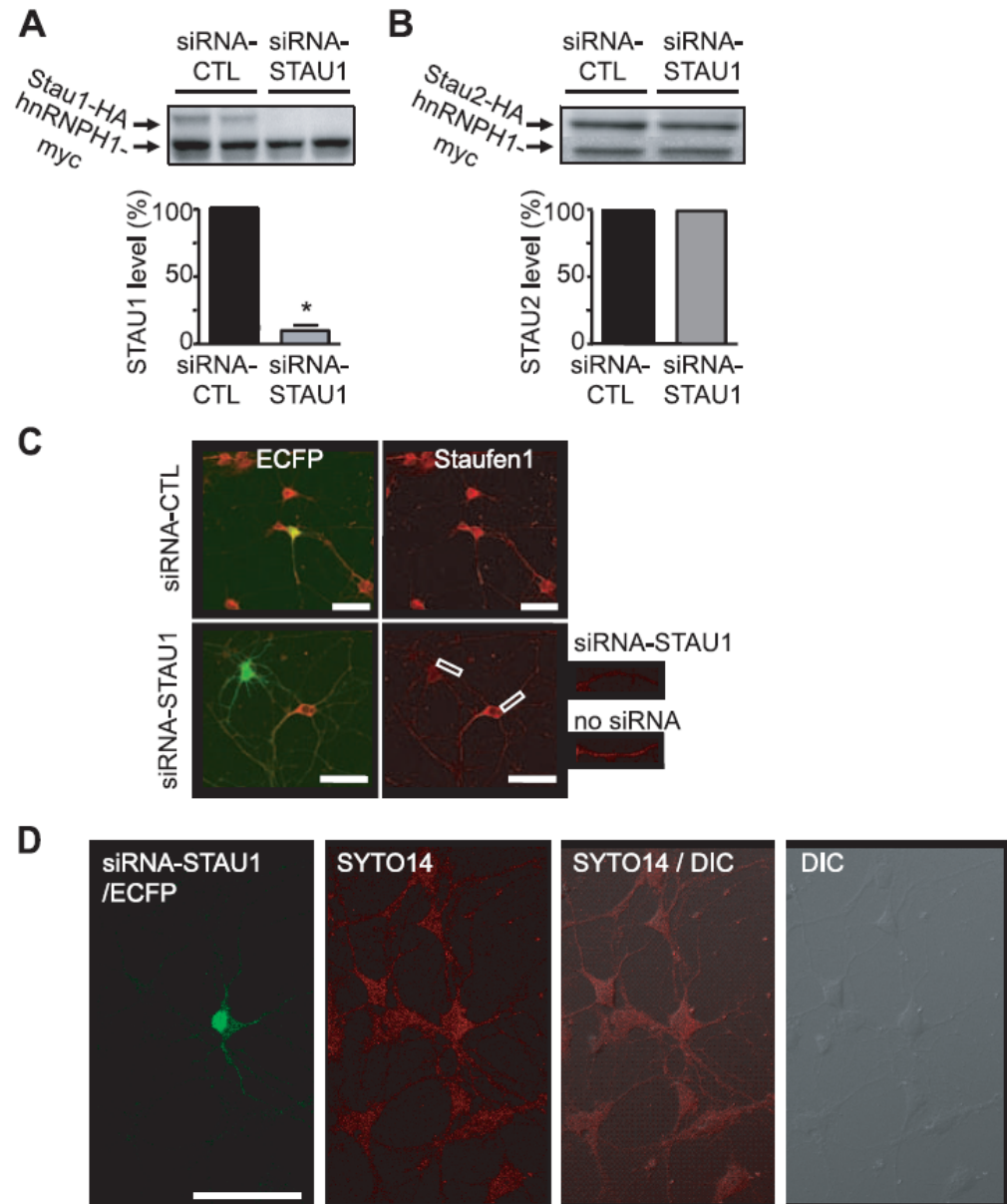


FIGURE 2: Down-regulation of Stau1 by siRNA in organotypic hippocampal slice cultures.

A, B, Slice cultures were biolistically transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Protein expression was monitored by western blotting using anti-Stau1 (A) or anti-Stau2 (B) antibodies. Examples from four representative slices are shown illustrating the selective down-regulation of endogenous Stau1 but not Stau2 expression levels (n= 6, 2 experiments). **C,** Immunocytochemical labelling for NeuN, showing intact neuronal populations in hippocampal slice cultures biolistically transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Scale bar, 100µm. **D, E,** Confocal images of representative hippocampal slice cultures biolistically transfected with Cy3-siRNA-CTL illustrating delivery of siRNA in CA1 pyramidal cells (*D*) and localization in superficial tissue in slices (*Z*-stack projections in *E*). *D*: Scale bar, 100 µm. ***Inset***, CA1 region, *or* stratum oriens, *pyr* stratum pyramidale, *rad* stratum radiatum. Scale bar, 50 µm. *E*: Scale bar, 20 µm.

FIGURE 2

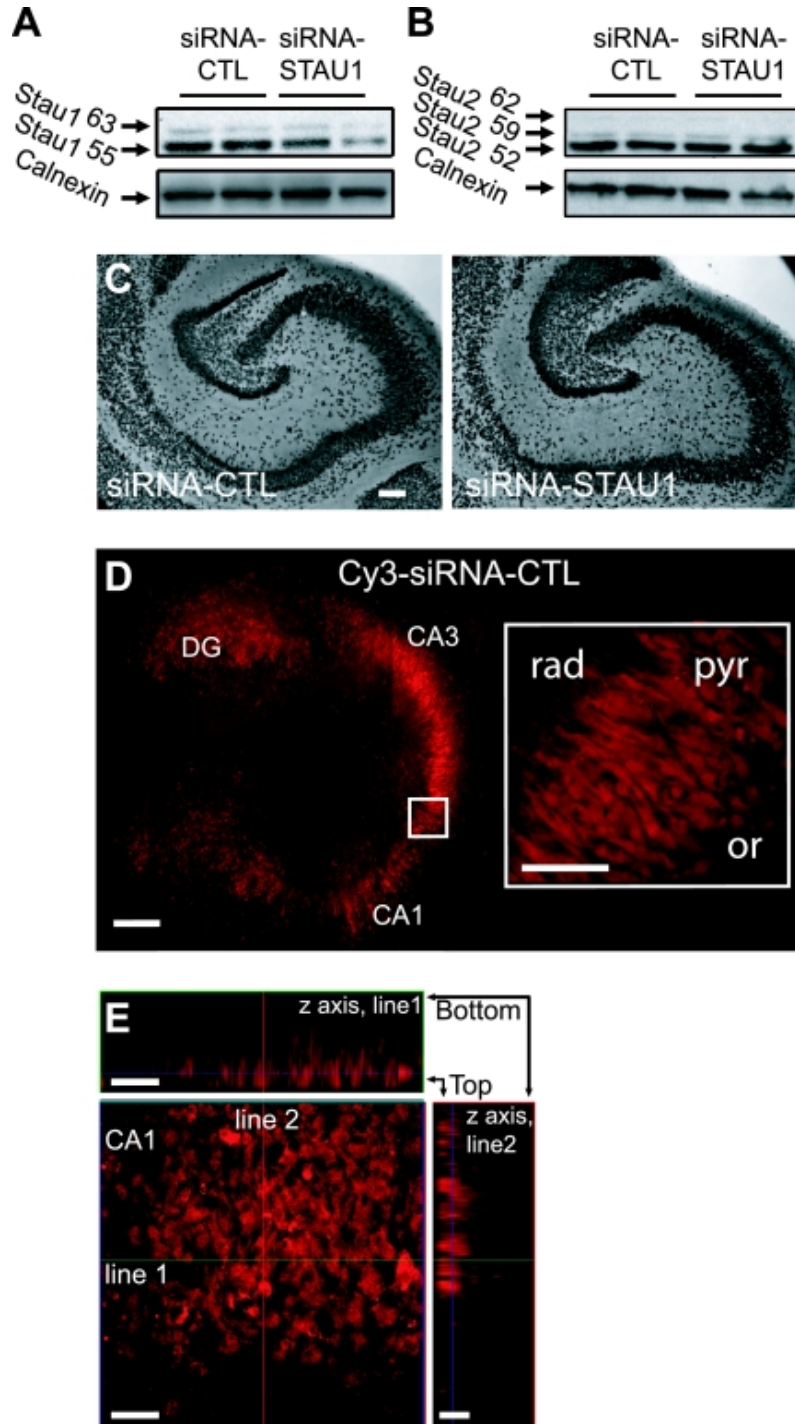


FIGURE 3: Stau1 siRNA transfection impairs chemically induced late-LTP in hippocampal slice cultures.

A-C, Plots of normalized fEPSP slope in representative experiments with slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (*A*) or in combination with siRNA-CTL (*B*) or siRNA-STAU1 (*C*). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) FSK application (50 μ M, 15 min) are shown above. fEPSP measures for the period from 0 to 90 min were excluded because of FSK-induced spontaneous activity interfering with accurate measurements of evoked fEPSPs (Kopec, Li et al. 2006). **D**, Summary plots of fEPSP changes for all group data (n=10 slices in each condition). **E**, Summary bar graph showing changes in fEPSP slope at 220 minutes post-FSK. Significant late-LTP was present in slices transfected with EYFP and siRNA-CTL but absent in slices transfected with siRNA-STAU1, indicating that down-regulation of Stau1 prevents L-LTP. **F**, Graph of input-output relation of fEPSP slope as function of stimulation intensity indicating no significant difference between groups with EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 transfection. **G**, Summary plot for all slices showing similar paired-pulse facilitation ratio (50-150 ms intervals) in groups with EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 transfection.* p<0.05.

FIGURE 3

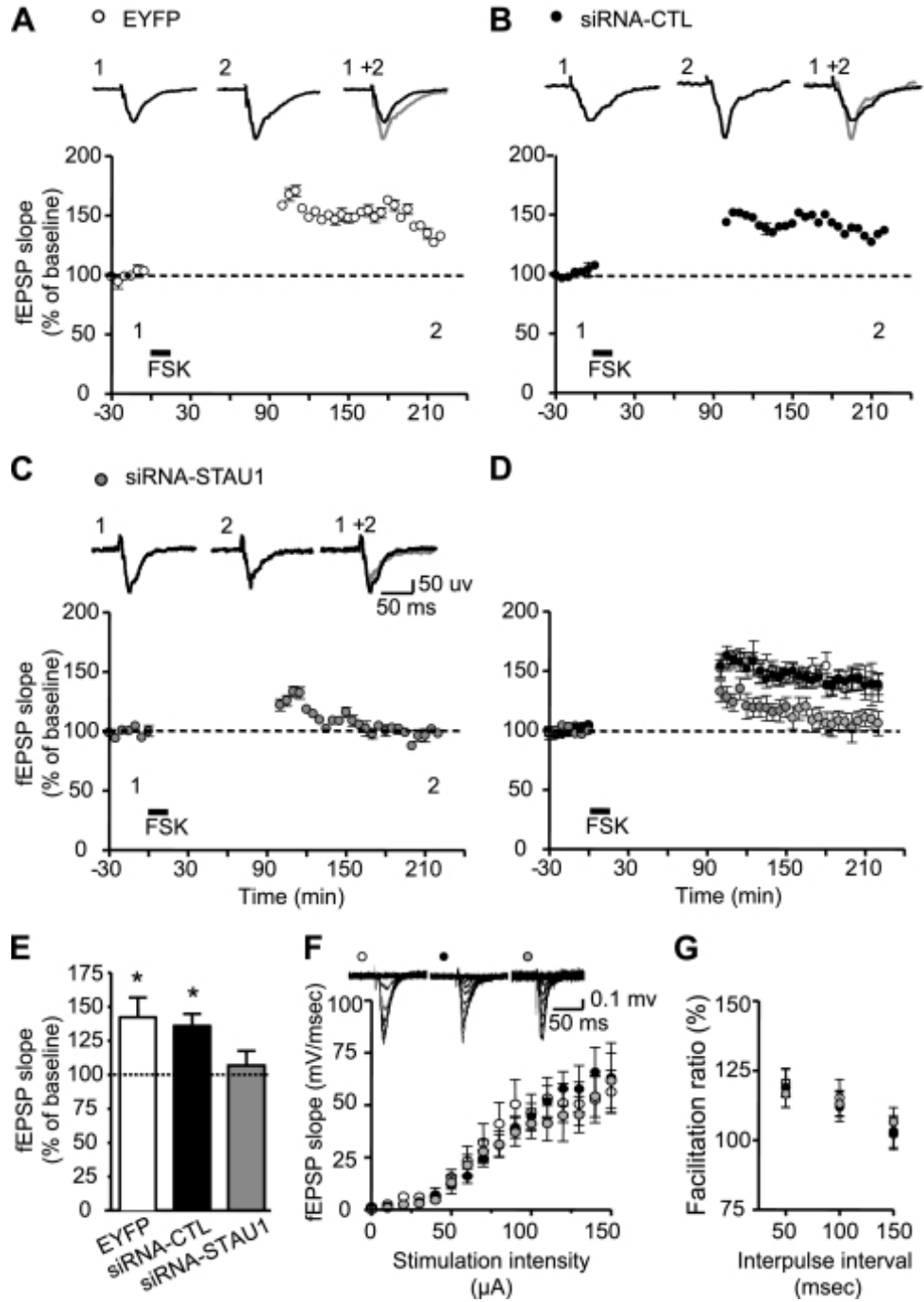


FIGURE 4: Stau1 siRNA transfection does not impair early-LTP in hippocampal slice cultures.

A-C, Plots of normalized fEPSP slope showing early-LTP induced by theta burst stimulation (TBS; arrow) in slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (*A*) or in combination with siRNA-CTL (*B*) or siRNA-STAU1 (*C*). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) TBS are shown above. **D**, Summary plots of fEPSP changes induced by TBS for all groups (n=6 slices in each condition). **E**, Summary bar graph showing LTP of fEPSP slope at 30 min post-TBS in all conditions and indicating that Stau1 siRNA transfection did not impair TBS-induced early-LTP. **F-G**, Similar summary plots (*F*) and bar graph (*G*) of fEPSP changes induced by high frequency stimulation (HFS; arrow) for all groups (n=4-5 slices in each condition), illustrating that Stau1 did not influence HFS-induced early-LTP. * p< 0.05.

FIGURE 4

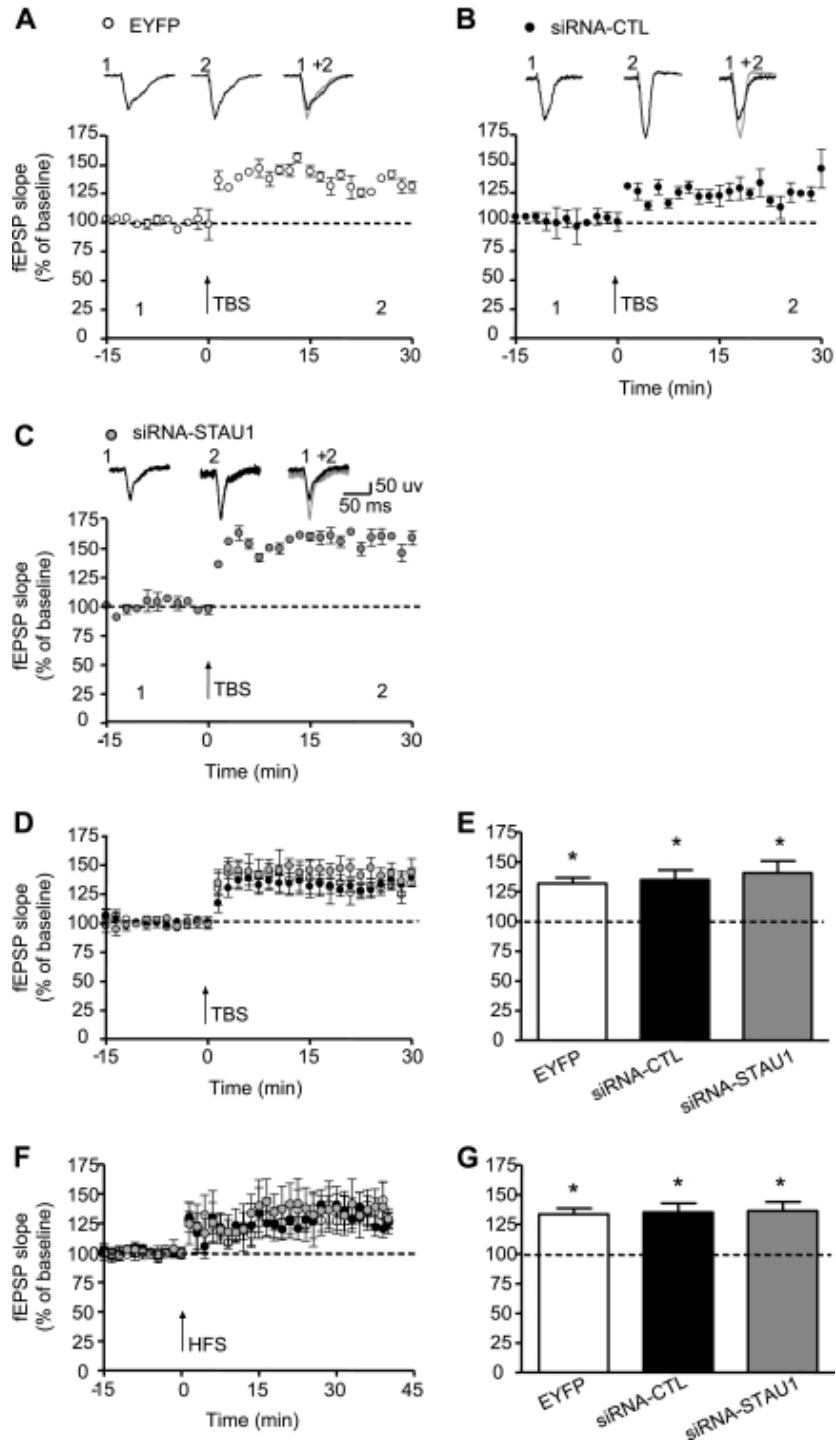


FIGURE 5: Stau1 siRNA transfection does not affect mGluR-dependent LTD in hippocampal slice cultures.

A-C, Plots of normalized fEPSP slope showing LTD induced by the mGluR1/5 agonist DHPG (100 μ M, 10 min) in slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (*A*) or in combination with siRNA-CTL (*B*) or siRNA-STAU1 (*C*). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) DHPG application are shown above. **D**, Summary plots of fEPSP changes induced by DHPG for all groups (n=10 slices in each condition). **E**, Summary bar graph showing LTD of fEPSP slope at 80 min post-DHPG in all conditions and indicating that Stau1 siRNA transfection did not impair mGluR-dependent LTD. * $p < 0.05$.

FIGURE 5

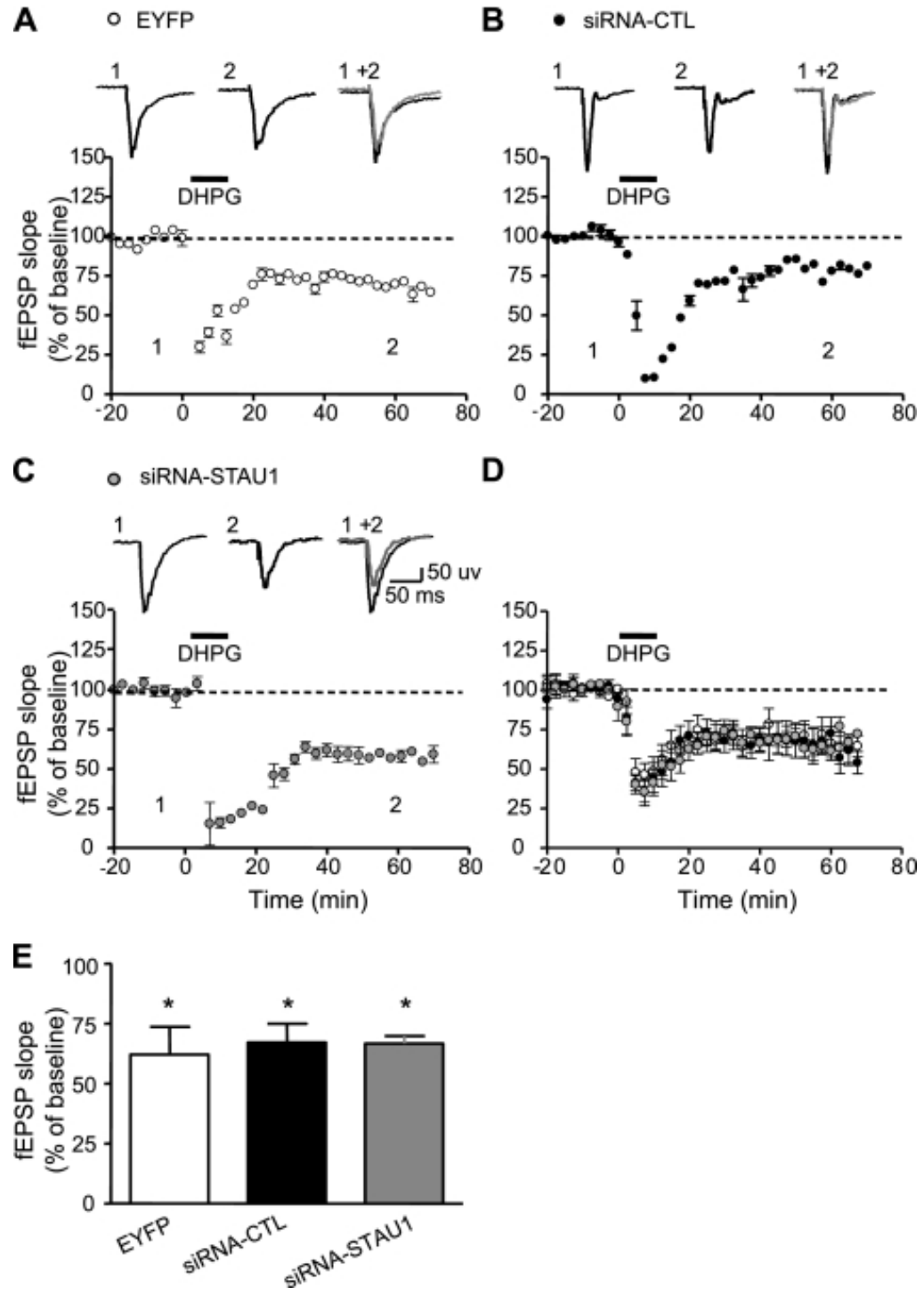


FIGURE 6: Stau1 siRNA transfection reduces frequency and amplitude of mEPSCs.

A, Representative traces from pyramidal neurons transfected with plasmid coding for EYFP (top) or co-transfected with siRNA-CTL (middle) or siRNA-STAU1 (bottom). **B-C**, Summary plots of cumulative distribution and summary bar graph of median of mEPSC amplitude (pA) (*B*) and inter-mEPSC intervals (sec) (*C*) for the corresponding groups (n = 7-9 cells in each group) showing decrease in amplitude and frequency of mEPSCs in neurons transfected with siRNA-STAU1. Error bars represent SD.

FIGURE 6

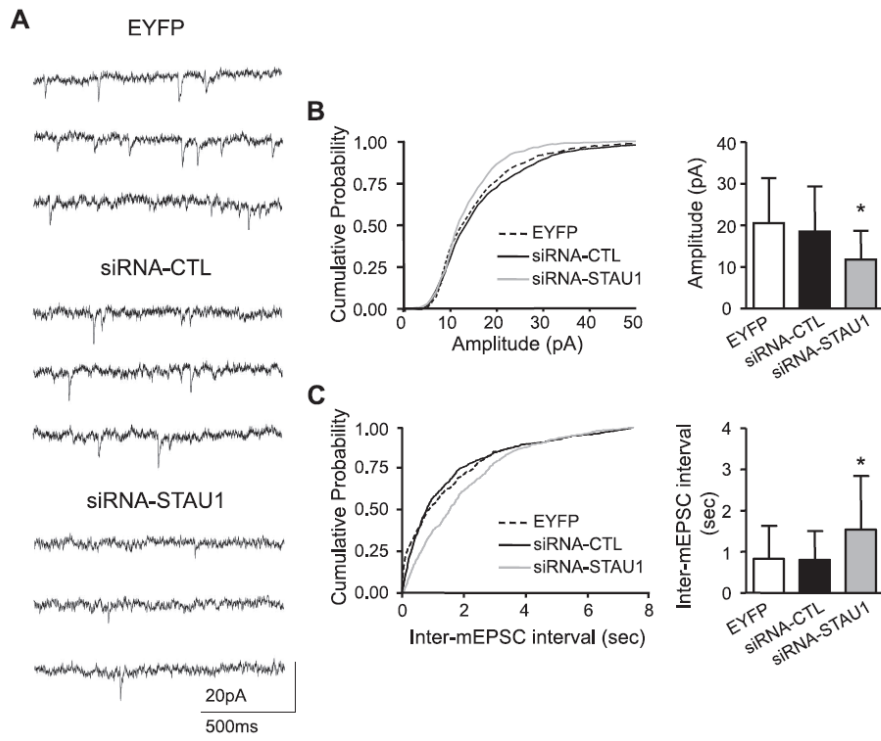


FIGURE 7: Stau1 siRNA transfection affects dendritic spine morphology.

A, Confocal images of representative CA1 pyramidal cells (left) and apical dendrites (right) after transfection with plasmid coding for EYFP (top) or co-transfection with siRNA-CTL (middle) or siRNA-STAU1 (bottom). **B**, Summary bar graph of spine density (per micron) of dendrite, showing unchanged density in all conditions. **C**, Cumulative plots of the distribution of spine length for each group, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length after transfection of siRNA-STAU1. **D**, Summary bar graph of number of regular, elongated or filopodia types of spines in cells of each group, showing decrease in regular and increases in elongated and filopodia types of spines after siRNA-STAU1 transfection.* $p < 0.05$.

FIGURE 7

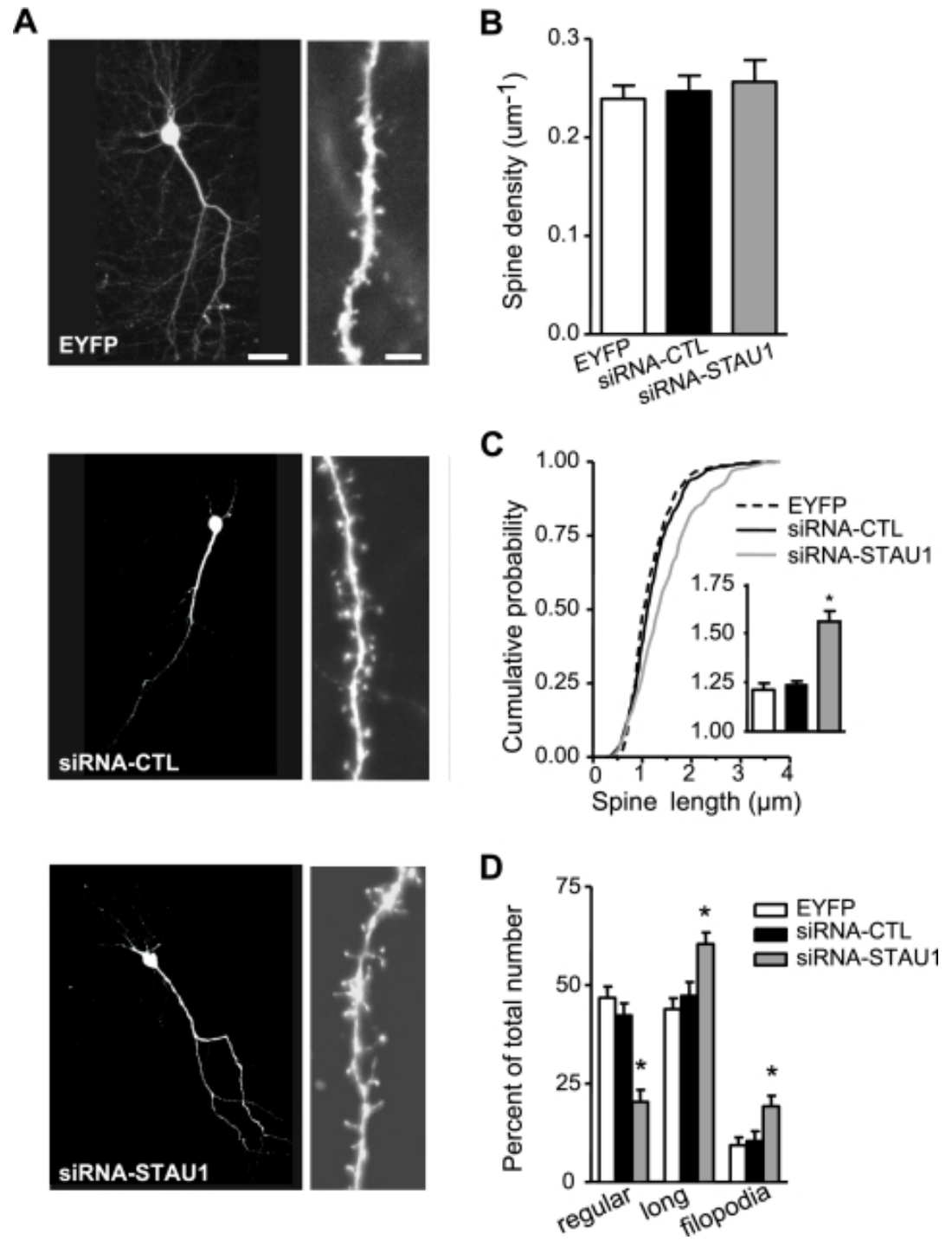
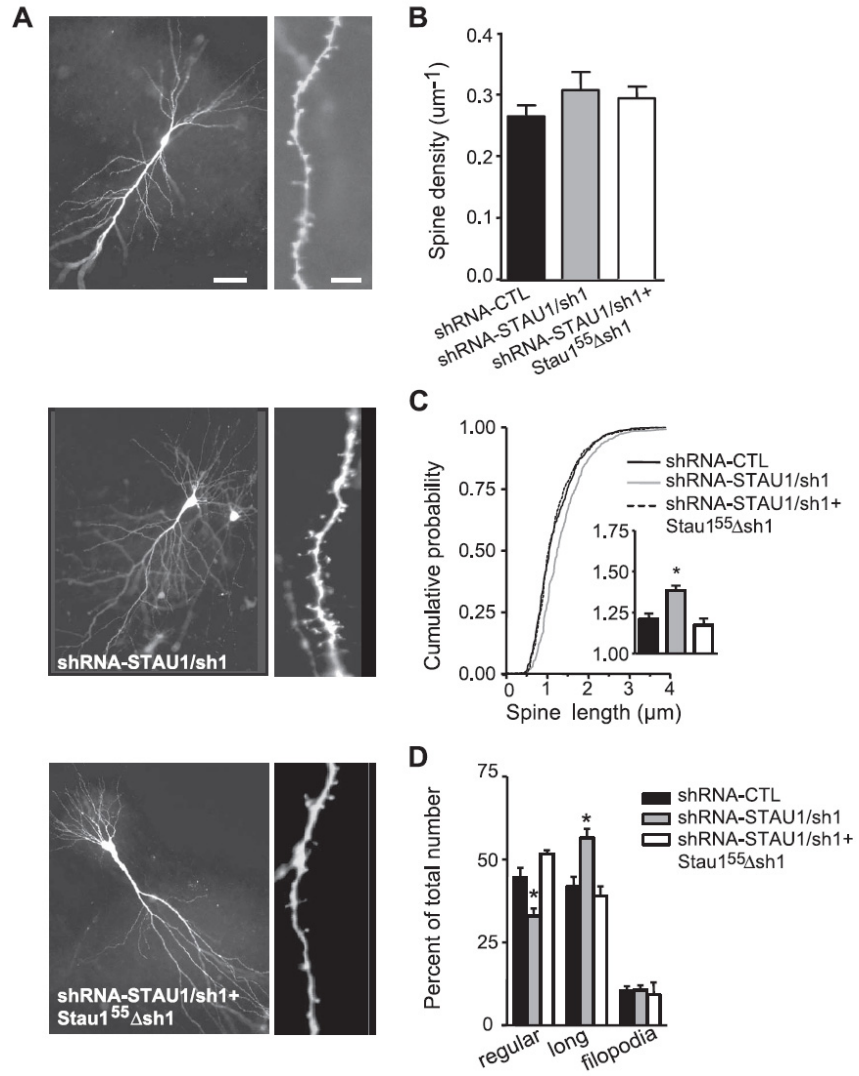


FIGURE 8: Dendritic spine morphology changes induced by Stau1 down-regulation using Stau1 shRNA and rescue by co-expression of Stau1⁵⁵Δsh1.

A, Confocal images of representative CA1 pyramidal cells (left) and apical dendrites (right) after co-transfection of plasmid coding for EYFP and shRNA-CTL (top), shRNA-STAU1/sh1 (middle) or shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 (bottom). **B**, Summary bar graph of spine density (per micron) of dendrite, showing unchanged density in all conditions. **C**, Cumulative plots of the distribution of spine length for each group, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length after transfection of shRNA-STAU1/sh1, and rescue by shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 transfection. **D**, Summary bar graph of number of regular, elongated or filopodia types of spines in cells of each group, showing decrease in regular and increases in elongated types of spines after shRNA-STAU1/sh1 transfection and rescue by shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 transfection.* p<0.05.

FIGURE 8



ARTICLE 3: Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains

MISE EN CONTEXTE

Il est connu que les complexes ribonucléoprotéiques transportent certains transcrits le long des dendrites jusqu'à leur site de traduction. Stau2 est une protéine liant l'ARN et dont l'importance dans le transport dendritique d'ARNm est déjà établie. De plus, celle-ci est impliquée dans la morphologie des épines ainsi que dans la plasticité synaptique. Cependant, l'identité des transcrits auxquels elle s'associe est inconnue. Dans l'optique d'identifier les populations d'ARNm neuronales liées à Stau2, nous avons entrepris d'immunoprécipiter Stau2 à partir d'un extrait de cerveau d'embryon de rat pour ensuite procéder à l'identification des transcrits à l'aide de micropuces d'ADN. Nous avons ainsi identifié 1780 transcrits associés aux mRNP de Stau2 codant pour des protéines majoritairement impliquées dans la modification post-traductionnelle, le métabolisme d'ARN, le transport et la traduction.

Cet article a été publié en 2010 dans *Biochemistry and Molecular Biology reports* aux pages 344-348.

Contribution(s) des auteurs :

MML : immunoprécipitation, isolement de l'ARN, RT-PCR, étude bioinformatique des populations d'ARNm, écriture du manuscrit

DL : étude bioinformatique des populations d'ARNm, écriture du manuscrit et supervision générale

**Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in
embryonic rat brains**

Marjolaine Maher-Laporte and Luc DesGroseillers*

Département de biochimie, Université de Montréal, PO Box 6128 Centre Ville, Montréal,
Québec, Canada. H3C 3J7

Running title: Stau2-associated mRNAs

*** Address correspondence to :**


Dr Luc DesGroseillers

Département de biochimie, Université de Montréal

PO Box 6128 Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7

Phone : 514-343-5802

Fax : 514-343-2210

Email : 

ABSTRACT

Messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) are used to transport mRNAs along neuronal dendrites to their site of translation. Staufen2 is an mRNA-binding protein expressed in the cell bodies and cellular processes of different brain cells. It is notably involved in the transport of dendritic mRNAs along microtubules. Its knockdown expression was shown to change spine morphology and impair synaptic functions. However, the identity of Staufen2-bound mRNAs in brain cells is still completely unknown. As a mean to identify these mRNAs, we immunoprecipitated Staufen2-containing mRNPs from embryonic rat brains and used a genome wide approach to identify Staufen2-associated mRNAs. The genome wide approach identified 1780 mRNAs in Staufen2-containing mRNPs that code for proteins involved in cellular processes such as post-translational protein modifications, RNA metabolism, intracellular transport and translation. These results represent an additional and important step in the characterization of Staufen2-mediated synaptic functions in rat brains.

Keywords: ribonucleoprotein; transport particle; mRNA localization; rat brains; microarray.

INTRODUCTION

mRNA transport is critical in many situations to differentially control protein content in domains distant from the cell body (Bassell, Oleynikov et al. 1999). In particular, transport and subsequent local translation are important for different aspects of synaptic functions and plasticity (Bassell, Oleynikov et al. 1999; Sossin and DesGroseillers 2006; Sanchez-Carbente and DesGroseillers 2008). Several mechanisms of mRNA transport have been described in dendrites ranging from a constitutive transport pathway to an activity-induced transport mechanism of newly transcribed mRNAs (Sossin and DesGroseillers 2006). It is believed that different mechanisms of mRNA transport are linked to different forms of synaptic activity and/or plasticity.

Upon transcription, nascent mRNAs associate with several factors that form messenger ribonucleoprotein particles (mRNP)(Sossin and DesGroseillers 2006). Along the way from nuclear export to dendritic anchoring, proteins are added or removed from the mRNP complexes in a dynamic way. These proteins finely control the successive steps that insure proper expression of mRNA at specific times and space. Staufen2 (Stau2), a protein mainly expressed in brain is a well accepted player for mRNA localization (Tang, Meulemans et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Monshausen, Gehring et al. 2004; Thomas, Martinez Tosar et al. 2005; Kim and Kim 2006; Jeong, Nam et al. 2007). In brain, Stau2 is expressed in several cell types including neurons and oligodendrocytes. Four Stau2 protein isoforms are generated by differential splicing. Stau2 isoforms bind double-stranded RNAs, are incorporated into mRNPs and display a microtubule-dependent somatodendritic distribution in neurons. In oligodendrocytes, Stau2-containing mRNPs are found in both the cell bodies and myelinating processes. Interestingly, over-expression of Stau2 in dendrites increases the amount of dendritic mRNAs showing the importance of Stau2 for mRNA transport (Tang, Meulemans et al. 2001). Neurons in which Stau2 has been down-regulated by RNAi show a reduced density of dendritic spines, associated with a change in their

morphology (Goetze, Tuebing et al. 2006). These phenotypes result in reduced amplitude of the miniature excitatory postsynaptic currents, a measure of synaptic transmission.

In the somatodendritic compartment, Stau2 associates with the two main types of cytoplasmic mRNA/protein complexes involved in transport: mRNA granules and mRNA transport particles (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). Whereas mRNA particles are devoid of ribosomes, mRNA granules form bigger complexes that are associated with ribosomes. It was suggested that RNA particles might represent the observed transport mRNPs (Kiebler and Bassell 2006). While the distribution and functions of Stau2 in brain cells begin to be elucidated, the identity of transported mRNAs is still unknown, preventing in-depth analyses of the molecular mechanisms involved in specific phenotypes. In this paper, we immunoprecipitated Stau2-containing mRNPs from embryonic rat brains and used a genome wide approach to identify Stau2-associated mRNAs. Several mRNAs coding for proteins mainly involved in protein modification, translation and intracellular trafficking were identified.

RESULTS

Identification of mRNAs in Stau2-containing mRNPs in embryonic brains

In order to identify the mRNA content of Stau2-containing RNPs, extracts of embryonic rat brains were prepared and endogenous Stau2 was immunoprecipitated using polyclonal anti-Stau2 antibodies and the pre-immune serum as control. To minimize the identification of non-specific mRNAs, two different polyclonal anti-Stau2 antibodies were used in parallel experiments (Fig. 1A). Co-immunoprecipitated mRNAs were purified. Commercially available rat DNA oligonucleotide microarrays from Illumina containing 22,226 probe sets were hybridized with cRNAs derived from Stau2-dependent IPs and controls (Fig. 1B). A total of 12 microarrays were hybridized: four with cRNA probes generated from mRNAs isolated with the anti-Stau2 L1 antibody, two with the anti-Stau2 L2 antibody and six with their respective pre-immune serum. To estimate the validity of these hybridization data, we first generated a PCA plot that translates into a particular space on the plot each measurement and structure of one gene expression data array (Khatua, Peterson et al. 2003). The PCA plot from the hybridization data of the twelve arrays shows that hybridization data are grouped together according to the antibody used for immunoprecipitation (L1, L2 or PI) (Fig. 1C) indicating reproducible hybridization data. It also indicates that both Stau2-derived hybridizations are different from those of the pre-immune arrays and that anti-Stau2 L1 and L2 antibodies are not perfectly identical. To identify Stau2-associated mRNAs, data were analyzed with the FlexArray 1.2 software (Blazejczyk 2007). We selected mRNAs that were enriched at least 8 fold in both Stau2-dependent IPs (to minimize non-specific hybridization) as compared to controls (p value < 0.002). Using these criteria, 1780 mRNAs were identified (Supplemental Table S1).

RT-PCR validation of identified mRNAs

Several mRNAs identified in the microarray experiments as being enriched in Stau2 mRNPs were validated by RT-PCR experiments. Genes that were enriched less than 6 fold were used as negative controls. Stau2-containing mRNPs were immunoprecipitated from embryonic rat brain extracts using anti-Stau2 antibodies and a pre-immune serum as control. Co-immunoprecipitated mRNA was isolated and RT-PCR amplified using specific primers (Fig. 2A,B). Consistent with the microarray data, several mRNAs were enriched in Stau2-containing complexes as compared to the pre-immune IP. Enrichment was observed with the two different anti-Stau2 antibodies. In contrast, control mRNAs were not enriched in Stau2-dependent immunoprecipitates as compared to those of the pre-immune serum indicating that they were absent from Stau2-containing complexes, as expected from the microarray data. Serial dilutions of the control mRNAs before RT-PCR amplification confirmed that the amplifications were in the linear range (Fig. 2B).

Gene ontology (GO)

Next, we identified pathways in which Stau2-associated mRNAs are involved as a mean to understand the biological functions of Stau2 in brain cells. Probe set lists have been analyzed with the BABELOMICS functional annotation tool (Al-Shahrour, Minguéz et al. 2005) to assign cellular functions to mRNAs that were enriched in Stau2-containing RNPs. The result from GO classification revealed that mRNAs associated with Stau2-containing RNPs are involved in cellular processes such as protein modification, RNA metabolism, translation and neurogenesis. Their molecular functions include kinase and phosphatase activities as well as ubiquitin ligase activity (Supplemental Table S2).

DISCUSSION

Stau2 is an RNA-binding protein mainly expressed in different cells of the brain (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Thomas, Martinez Tosar et al. 2005) and its importance for mRNA transport in dendrites (Tang, Meulemans et al. 2001; Jeong, Nam et al. 2007) and synaptic functions (Goetze, Tuebing et al. 2006) has been established. RNA transport is a complex process that relies on a highly heterogeneous population of mRNA particles and granules (Sossin and DesGroseillers 2006). The differential presence/absence of RNA-binding proteins and other cofactors in each mRNP determines the roles of each mRNP complex and the fate of associated mRNAs. These proteins regulate gene expression at the post-transcriptional level in a mechanism widely used by mammalian cells to control protein synthesis with acute precision (Hieronymus and Silver 2004; Moore 2005). Identification of Stau2-bound mRNAs in embryonic brain cells is a further step for our understanding of Stau2 functions in agreement with the post-transcriptional regulon theory (Keene 2007). This theory stipulates that RNA-binding proteins such as Stau2 mediate the coordinate post-transcriptional expression of bound mRNAs according to cell signalling. The major molecular functions associated with mRNAs identified in Stau2-containing mRNPs in brains are related to protein modifications such as phosphorylation, dephosphorylation and ubiquitination. This is very interesting since these processes are well characterized in neurons and oligodendrocytes and most of the signalling events are regulated at least in part by protein modifications (Walsh, Garneau-Tsodikova et al. 2005; Yang 2005). A significant reduction in the local synthesis of kinases and/or phosphatases could easily explain the reduction of dendritic spines and the increase of elongated filopodia-like structures that were observed following Stau2 down-regulation in neurons (Goetze, Tuebing et al. 2006). Other major Stau2-associated GO groups include intracellular transport, translation, RNA metabolism, neurogenesis and synaptic functions. This classification suggests that Stau2 mRNPs may carry mRNAs whose translation

generates proteins involved in the regulation of their own transport, translation and degradation allowing an auto-stimulatory process after an initial signalling event.

According to our microarray data that identified β -*actin* mRNA as a target of Stau2, it was previously shown that the down-regulation of Stau2 by RNA interference in mature neurons caused a significant reduction in β -*actin* mRNA expression level and fewer dendritic β -*actin* mRNPs (Goetze, Tuebing et al. 2006). To explain these results, it was proposed that Stau2 binds to β -*actin* mRNA and controls its fate. Our microarray results indicate that, indeed, Stau2 binds to β -*actin* mRNA. However, its role in the post-transcriptional regulation of β -*actin* and/or other mRNAs in brain cells is not yet clear. Stau2 may influence mRNA transport and/or localization in cellular processes since previous work has implicated Stau2 in dendritic mRNA transport (Tang, Meulemans et al. 2001; Kim and Kim 2006; Jeong, Nam et al. 2007). Alternatively, based on known functions of its paralog Stau1, Stau2 may also control the stability or the translation of specific mRNAs. Indeed, Stau1 elicits mRNA decay of a sub-population of transcripts when bound to their 3'UTR (Kim, Furic et al. 2005) and enhances translation of other mRNAs when bound to their 5'UTR (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005). This latter function of Stau1 is consistent with a role of *Drosophila* Staufen in *oskar* mRNA translation once localized to the posterior pole (Kim-Ha, Kerr et al. 1995; Micklem, Adams et al. 2000). It will be interesting to determine the role of Stau2 in the post-transcriptional regulation of bound mRNAs.

Using the Affimetrix platform for microarray analyses, we recently identified mRNAs that are associated with over-expressed Stau2-HA₃ in the human epithelial HEK293 cell line (Furic, Maher-Laporte et al. 2008). Despite the fact that the present study identified mRNAs bound to endogenous Stau2 using the Illumina technology, it is relevant to compare these mRNA populations as a mean to get some clues on Stau2 mRNA-binding specificity in different tissues. Comparison of gene symbols and/or orthologs identified 218 common Stau2-associated mRNAs in the two studies (Table S3). Considering that 983 of

the 1780 Illumina probe sets have a gene symbol that is shared by Affymetrix probe sets, we estimate that only 22% of the mRNAs associated with endogenous Stau2 in brains are also present in Stau2-HA₃-containing mRNPs in human. This relatively low percentage of common mRNAs suggests that either we have characterized a specialized sub-population of mRNPs expressed in brains or that the sub-population of Stau2-bound mRNAs differs in different tissues probably due to the differential availability of mRNAs and cofactors that constitute the mRNPs. It makes sense that mRNAs required for local translation in specialized sub-cellular domains such as distal dendrites of neurons or myelinating processes of oligodendrocytes are different from those required in epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation of Stau2-containing mRNPs was performed on cell extracts prepared from whole brains of E17-E18 Sprague Dawley rat embryos. Cells were dissociated with a manual putter and lysed in the ice-cold lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 15 mM EGTA, 1 mM DTT and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)] containing 2 U/ml rRNasin (Invitrogen) as described (Furic, Maher-Laporte et al. 2008). All further manipulations of the brain lysates were performed at 4°C. Cell lysates were centrifuged at 9300g for 10 min to remove nuclei and cell debris. After centrifugation, supernatants were incubated with rabbit polyclonal anti-Stau2 antibodies or pre-immune serum (Duchaine, Hemraj et al. 2002) for 2 hours at 4°C, then with a 50% protein A-sepharose slurry for 2 hours at 4°C as described before (Duchaine, Wang et al. 2000), except that Escherichia coli tRNA (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 200 mg/mL. Immune complexes were washed five times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in elution buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM DTT and 4% SDS). RNAs were isolated by Trizol (Invitrogen) extraction according to manufacturer instructions.

Microarray hybridization and RT-PCR validation

RNA pellets were solubilized in water and residual contaminants were removed using an RNA nanoprep column (Stratagene). Biotinylated cRNA probes were synthesized by the TotalPrep RNA labelling kit (Ambion). Illumina rat genome arrays (RatRef-12_V1 Expression BeadChip comprising 22,226 probe sets) were used for hybridization according to Illumina guidelines. Hybridized chips were scanned using an Illumina iScan System.

Results were recorded using the BeadStudio software platform. To identify mRNAs that specifically copurify with Stau2, signal intensities obtained for specific IPs were compared with the baseline signal intensities of control IPs using the FlexArray 1.2 software (Blazejczyk 2007). Each probe set presenting a fold enrichment over control of more than 8 (t-test p value < 0.002) was scored as a potential Stau2-associated mRNA. Complete microarray analysis results can be found in the Supplemental Data. Microarray data have been deposited in the GEO database and are available through the series accession number GSE16437. For validation, RT-PCR was performed as described before (Ryu, Yang et al. 2007; Yang, Yoo et al. 2007; Furic, Maher-Laporte et al. 2008). Primer pairs are listed in Supplemental Table S4.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Louise Cournoyer for her help with tissue cultures; the Genome Quebec Innovation Centre, in particular André Ponton, for microarray screening and analysis. This work was supported by operating and group grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to LDG. MML was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

REREFENCES

1. Bassell, G. J., Oleynikov, Y. and Singer, R. H. (1999) The travels of mRNAs through all cells large and small. *Faseb J* **13**, 447-454.
2. Sanchez-Carbente, M. and DesGroseillers, L. (2008) Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* **169**, 41-58.
3. Sossin, W. S. and DesGroseillers, L. (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**, 1581-1589.
4. Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A. and DesGroseillers, L. (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* **115**, 3285-3295.
5. Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. and Schuman, E. (2001) A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463-475.
6. Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S. and Boccaccio, G. L. (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* **16**, 405-420.
7. Monshausen, M., Gehring, N. H. and Kosik, K. S. (2004) The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular Med* **6**, 127-144.
8. Jeong, J. H., Nam, Y. J., Kim, S. Y., Kim, E. G., Jeong, J. and Kim, H. K. (2007) The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin

motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* **102**, 2073-2084.

9. Kim, K. C. and Kim, H. K. (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* **397**, 48-52.

10. Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M. M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P. and Kiebler, M. A. (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* **172**, 221-231.

11. Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. and Kiebler, M. A. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2100-2105.

12. Kiebler, M. A. and Bassell, G. J. (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**, 685-690.

13. Khatua, S., Peterson, K. M., Brown, K. M., Lawlor, C., Santi, M. R., LaFleur, B., Dressman, D., Stephan, D. A. and MacDonald, T. J. (2003) Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling. *Cancer Res* **63**, 1865-1870.

14. Blazejczyk, M., Miron, M., Nadon, R. (2007) FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. Genome Quebec, Montreal, Canada, <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>

15. Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L. and Dopazo, J. (2005) BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* **33**, W460-464.

16. Hieronymus, H. and Silver, P. A. (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* **18**, 2845-2860.
17. Moore, M. J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**, 1514-1518.
18. Keene, J. D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**, 533-543.
19. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. and Gatto, G. J., Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 7342-7372.
20. Yang, X. J. (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* **24**, 1653-1662.
21. Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. and Maquat, L. E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**, 195-208.
22. Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J. and DesGroseillers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* **33**, 4797-4812.
23. Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald, P. M. (1995) Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**, 403-412.
24. Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S. and St Johnston, D. (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* **19**, 1366-1377.

25. Furic, L., Maher-Laporte, M. and DesGroseillers, L. (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* **14**, 324-335.
26. Duchaine, T., Wang, H. J., Luo, M., Steinberg, S. V., Nabi, I. R. and DesGroseillers, L. (2000) A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* **20**, 5592-5601.
27. Ryu, N. K., Yang, M. H., Jung, M. S., Jeon, J. O., Kim, K. W. and Park, J. H. (2007) Gene expression profiling of rewarding effect in methamphetamine treated Bax-deficient mouse. *J Biochem Mol Biol* **40**, 475-485.
28. Yang, M. H., Yoo, K. H., Yook, Y. J., Park, E. Y., Jeon, J. O., Choi, S. H., Park, S. Y., Woo, Y. M., Lee, M. J. and Park, J. H. (2007) The gene expression profiling in murine cortical cells undergoing programmed cell death (PCD) induced by serum deprivation. *J Biochem Mol Biol* **40**, 277-285.

FIGURES AND LEGENDS

FIGURE 1 :Immunoprecipitation of Stau2 isoforms.

(A) Immunoprecipitation of Stau2 isoforms from embryonic E17-18 rat brain extracts using two different polyclonal anti-Stau2 antibodies, L1 (St2-L1) and L2 (St2-L2). Pre-immune (PI) sera were used as controls. The Stau2⁵⁶ isoform is not visible in these cell extracts. * represents a non-specific IgG band. **(B)** Analysis of the mRNAs present in Stau2-containing mRNPs. Co-immunoprecipitated mRNAs were purified and used to generate cRNA probes. Probes were analyzed by electrophoresis and visualized on electrophoregrams. **(C)** Each hybridization profile was plotted on a PCA plot as a mean to determine the reproducibility of the hybridization data.

FIGURE 1

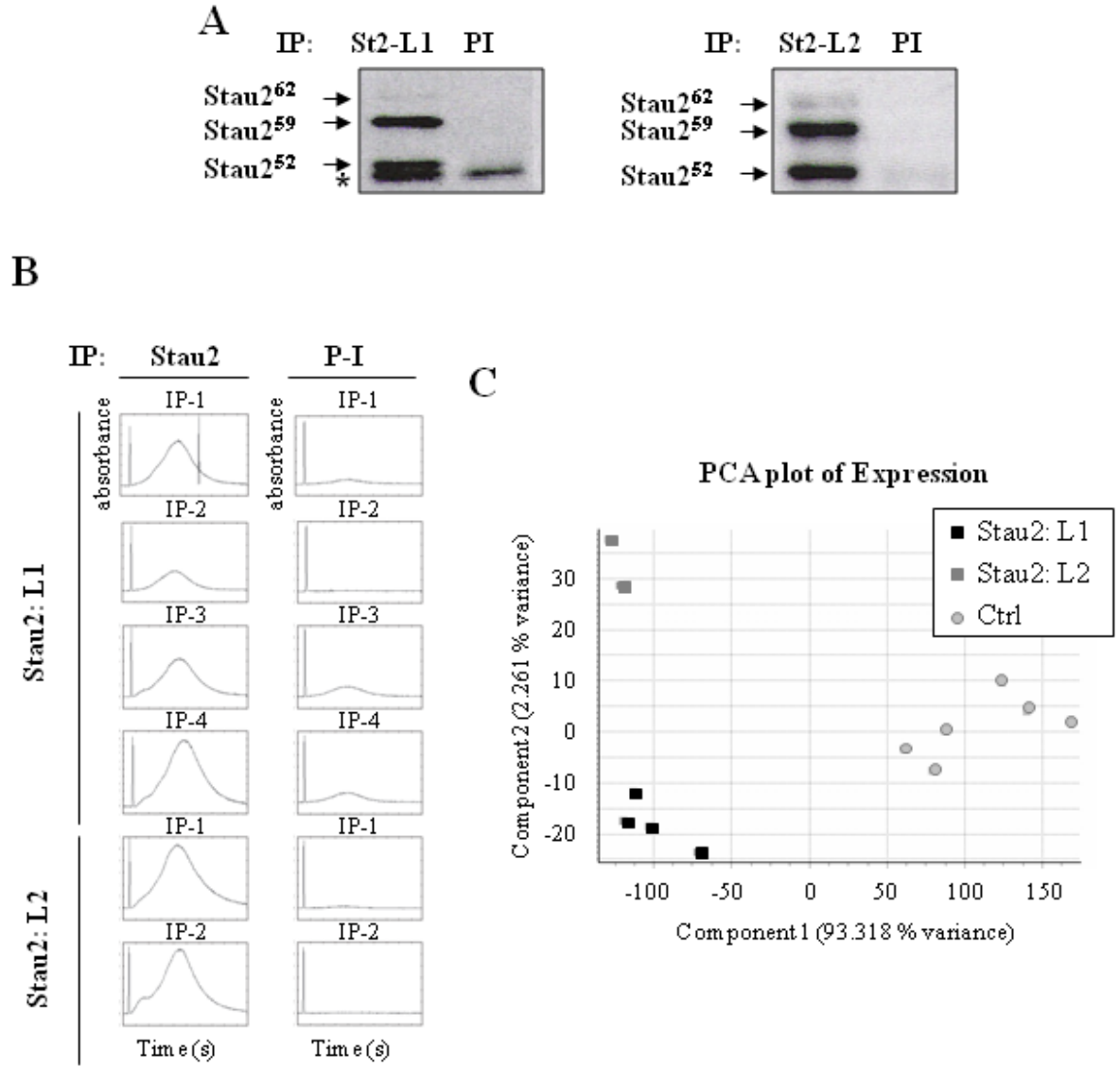
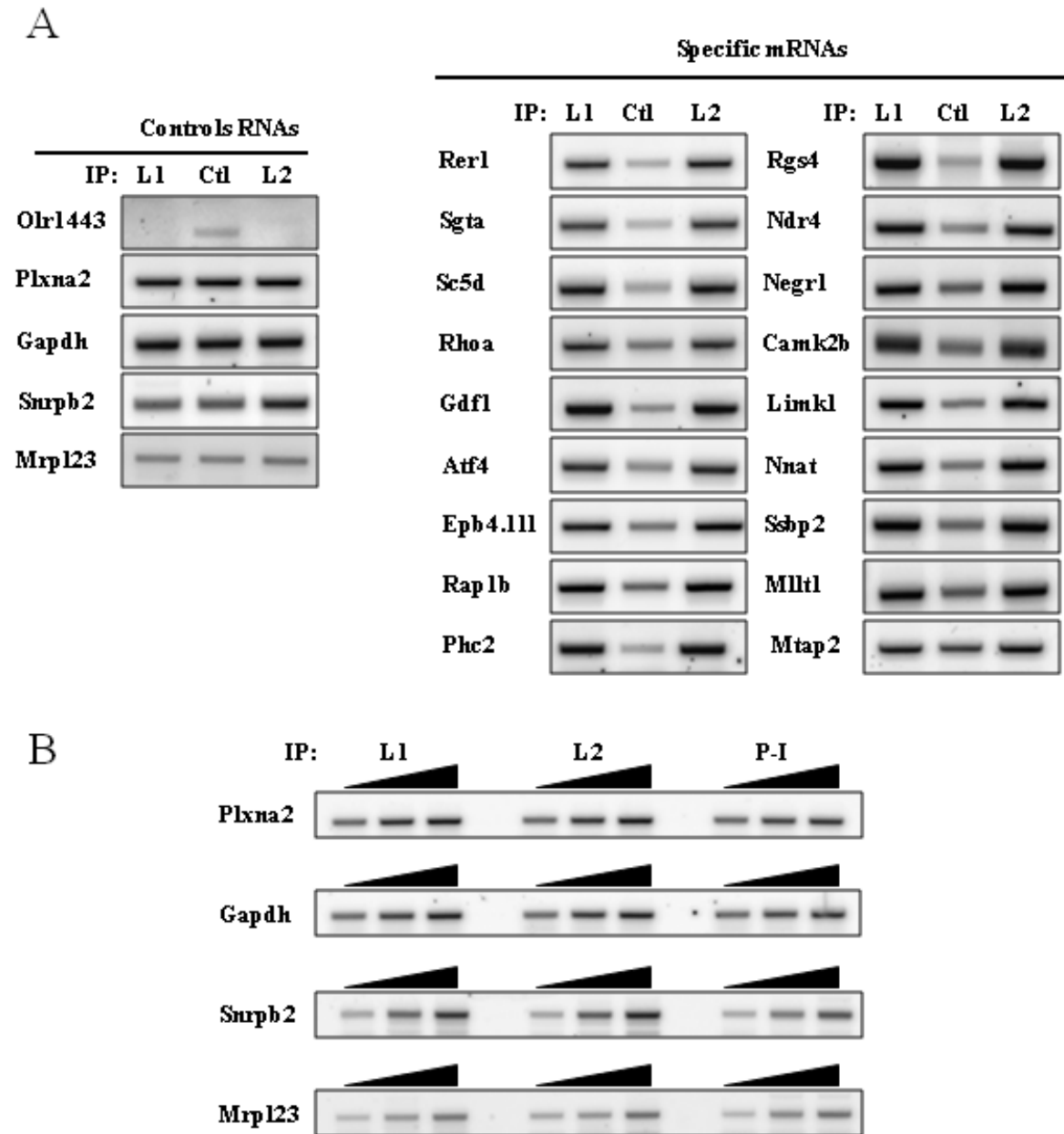


FIGURE 2: RT-PCR amplification of selected mRNAs following mRNPs immunoprecipitation.

(A) Stau2-containing mRNPs were immunoprecipitated from rat embryonic brains using two different polyclonal rabbit antibodies (L1 and L2) or the pre-immune sera. Co-immunoprecipitated mRNA was purified and RT-PCR amplified with pairs of oligonucleotides (Supplemental Table S4) specific for microarray-identified genes as indicated. Control (**left panel**) and Stau2-associated (**right panel**) genes were chosen according to their differential enrichment in Stau2-containing mRNPs according to the microarray data (Table S1). (B) Serial dilutions of the control mRNAs after the immunoprecipitation step indicate that the RT-PCR amplification reactions were in the linear range. These results were representative of at least two experiments.

FIGURE 2



ARTICLE 4 : Molecular composition of Stau2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain

MISE EN CONTEXTE

Stau2 est une protéine que l'on retrouve dans les particules de transport dendritique d'ARNm et dont l'importance au niveau neurophysiologique est déjà établie. Afin de mieux comprendre le rôle de Stau2 au sein de ces mRNP, nous avons entrepris d'identifier d'autres facteurs protéiques faisant partie de ceux-ci et pouvant agir de concert avec Stau2. Pour ce faire, nous avons immunoprécipité Stau2 à partir d'extraits de cerveaux d'embryons de rat et avons isolé les protéines associées. Nous avons ensuite procédé à l'identification de celles-ci par analyse en spectrométrie de masse. De cette façon, nous avons identifié au sein des particules de Stau2 des protéines liant l'ARN (PABPC1, hnRNPH1, YB1, hsc70), des protéines du cytosquelette (α - et β -tubuline), de même que la protéine peu caractérisée RUFY3. En poussant davantage la caractérisation, nous avons établi que YB1 et PABPC1 étaient associées de façon ARN dépendante à Stau2 alors que la protéine hsc70, au contraire, interagissait directement avec celle-ci. De plus, cette dernière association semble être modulable par l'action de l'ATP.

Cet article a été publié en juin 2010 dans *PLoS One* (e11350)

Contribution(s) des auteurs :

MLM : immunoprécipitation, culture de cellules HEK293 et de neurones, immunofluorescence, microscopie confocale, purification de protéines, GST-pull down, écriture du manuscrit

BF : résonance plasmonique de surface

MM : immunofluorescence, microscopie confocale

JLA : immunoprécipitation

LG : immunofluorescence, microscopie confocale

MM : résonance plasmonique de surface

DL: écriture du manuscrit et supervision générale

Molecular Composition of Staufen2-Containing Ribonucleoproteins in Embryonic Rat Brain

Marjolaine Maher-Laporte¹, Frédéric Berthiaume², Mireille Moreau¹, Louis-André Julien¹,
Gabriel Lapointe¹, Michael Mourez² and Luc DesGroseillers¹

¹Département de biochimie and ²Pathologie et microbiologie, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada.

Address correspondence to :


Dr Luc DesGroseillers

Département de biochimie, Université de Montréal

PO Box 6128 Centre Ville, Montréal, Québec, Canada. H3C 3J7

Phone : 514-343-5802

Fax : 514-343-2210

Email : 

Keywords: ribonucleoprotein; transport particle; mRNA localization; hippocampal neurons; proteomics

ABSTRACT

Messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) are used to transport mRNAs along neuronal dendrites to their site of translation. Numerous mRNA-binding and regulatory proteins within mRNPs finely regulate the fate of bound-mRNAs. Their specific combination defines different types of mRNPs that in turn are related to specific synaptic functions. One of these mRNA-binding proteins, Stau2, was shown to transport dendritic mRNAs along microtubules. Its knockdown expression in neurons was shown to change spine morphology and synaptic functions. To further understand the molecular mechanisms by which Stau2 modulates synaptic function in neurons, it is important to identify and characterize protein co-factors that regulate the fate of Stau2-containing mRNPs. To this end, a proteomic approach was used to identify co-immunoprecipitated proteins in Stau2-containing mRNPs isolated from embryonic rat brains. The proteomic approach identified mRNA-binding proteins (PABPC1, hnRNP H1, YB1 and hsc70), proteins of the cytoskeleton (α - and β -tubulin) and RUFY3 a poorly characterized protein. While PABPC1 and YB1 associate with Stau2-containing mRNPs through RNAs, hsc70 is directly bound to Stau2 and this interaction is regulated by ATP. PABPC1 and YB1 proteins formed puncta in dendrites of embryonic rat hippocampal neurons. However, they poorly co-localized with Stau2 in the large dendritic complexes suggesting that they are rather components of Stau2-containing mRNA particles. All together, these results represent a further step in the characterization of Stau2-containing mRNPs in neurons and provide new tools to study and understand how Stau2-containing mRNPs are transported, translationally silenced during transport and/or locally expressed according to cell needs.

INTRODUCTION

In neurons, mRNA transport is widely used to differentially regulate protein content in domains distant from the cell body (Bassell, Oleynikov et al. 1999). Especially, mRNA transport and local translation are known to be involved in neuron development, synaptic functions and plasticity (Kiebler and Bassell 2006; Sossin and DesGroseillers 2006; Sanchez-Carbente and DesGroseillers 2008). A current model stipulates that, along the way from nuclear export to dendritic anchoring, proteins are added or removed from the mRNP complexes in a dynamic way. It was proposed that these proteins finely control the successive steps that ensure proper expression of mRNA at specific times and space. Several combinations of mRNAs and proteins form a highly heterogeneous population of ribonucleoprotein (RNP) complexes that are linked to different forms of synaptic activity and/or plasticity (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Mallardo, Deitinghoff et al. 2003; Lebeau, Maher-Laporte et al. 2008). In particular, two large families of RNPs have been suggested: mRNA particles and mRNA granules (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003; Sossin and DesGroseillers 2006). mRNA particles are distinguished from mRNA granules by the absence of ribosomes. It was suggested that RNA particles might represent the observed transport mRNPs (Kiebler and Bassell 2006).

Staufen2 (Stau2), a protein mainly expressed in brain is a well accepted player for mRNA localization (Tang, Meulemans et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002). The *Stau2* gene expresses four protein isoforms of 62, 59, 56 and 52 kDa that are generated by differential splicing (Fig. 1) (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Stau2 binds double-stranded RNAs and is incorporated into mRNPs that move along microtubules in neuronal dendrites (Tang, Meulemans et al. 2001; Duchaine, Hemraj et al. 2002; Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). Interestingly, its level of expression in dendrites regulates the level of transported mRNAs showing the importance of Stau2 for mRNA transport. Likely as a consequence, neurons in which Stau2 has been down-regulated by RNAi show a reduced density of

dendritic spines, associated with a change in their morphology. These phenotypes result in reduced amplitude of the miniature excitatory postsynaptic currents, a measure of synaptic transmission (Goetze, Tuebing et al. 2006).

Stau2 was described in both the nucleus and somatodendritic compartment of the cells (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Macchi, Brownawell et al. 2004). Accordingly, Stau2 was shown to associate with nuclear factors suggesting an early role for Stau2 in mRNP assembly (Monshausen, Gehring et al. 2004; Elvira, Massie et al. 2006). In the somatodendritic compartment, Stau2 associates with both mRNA granules and mRNA particles. On a sucrose gradient, Stau2⁶² co-fractionates with ribosome-free particles whereas Stau2⁵⁹ and Stau2⁵² were found in fractions that contained ribosomes (Duchaine, Hemraj et al. 2002). However, the composition of these complexes is still largely unknown. In the work described in this paper, we immunoprecipitated Stau2-containing mRNPs and used a proteomic approach to identify Stau2-associated proteins. Several RNA-binding proteins and proteins of the cytoskeleton have been identified.

RESULTS

Isolation and characterization of Stau2-containing mRNPs

In order to identify the protein content of Stau2-containing RNPs, extracts of embryonic rat brains were prepared and endogenous Stau2 was immunoprecipitated using the polyclonal anti-Stau2 antibody L1 and its pre-immune serum as control (Fig. 1). Following separation of co-immunoprecipitated proteins by SDS-PAGE, the gel was cut into bands of 3 mm and the proteins digested in-gel with trypsin. Resulting peptides were identified by mass spectrometry. In addition to Stau2, seven proteins were present in the Stau2 immunoprecipitate (Table I and Supplemental Table S1). Y box-binding protein 1 (YB1), polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), heat-shock cognate protein 70 (hsc70) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (hnRNP H1) are RNA-binding proteins previously associated with other mRNPs, α - and β -tubulin are protein components of the cytoskeleton and RUFY3 (rap2-interacting protein X) is still poorly characterized.

PABPC1, YB1, and hsc70 co-immunoprecipitate with Stau2⁶² and Stau2⁵⁹

It was previously shown that Stau2⁶² co-fractionated with ribosome-free mRNPs whereas Stau2⁵⁹ and Stau2⁵² isoforms were found in heavy fractions that also contained ribosomes (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Therefore, we first tested whether the association between Stau2 and the identified RNA-binding proteins is specific for one Stau2 isoform or present in different complexes. In addition, we determined whether the association is direct or whether it involves an RNA intermediate. To this end, N2A cells were transfected with plasmids coding for Stau2⁶²-HA₃ or Stau2⁵⁹-HA₃ and tagged proteins

as indicated (Fig. 2). Cell extracts were prepared and Stau2 was immunoprecipitated using anti-HA antibody, in the presence or absence of the micrococcal nuclease. Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by western blotting using anti-myc or anti-GFP antibody as indicated. In the absence of micrococcal nuclease, PABPC1-myc, YB1-CFP and hsc70-CFP were found in Stau2⁶²-HA₃ and Stau2⁵⁹-HA₃ immunoprecipitates indicating that they are present in the same complexes as Stau2-HA₃ isoforms (Fig. 2 A-C). In contrast, hnRNP H1-myc was not detected (Fig. 2D). When micrococcal nuclease was added to the cell extracts before immunoprecipitation, Stau2⁶²-HA₃ and Stau2⁵⁹-HA₃ interaction with hsc70-CFP was still observed (Fig. 2C) whereas interactions with PABPC1-myc and YB1-CFP were lost (Fig. 2 A,B). These results show that several RNA-binding proteins are present in the same complexes as Stau2 isoforms and suggest that only the Stau2/hsc70 interaction involved direct protein-protein interaction.

Direct interaction between hsc70 and Stau2⁶²

To confirm the interaction between hsc70 and Stau2 at the protein level, we performed two in vitro binding assays, GST-pull down and surface plasmon resonance (SPR). To this end, bacterially expressed GST, maltose-binding protein (MBP), GST-hsc70 and MBP-Stau2⁶² fusion proteins were affinity purified (Fig. 3A). For the pull down assay, GST as a negative control and GST-hsc70 were attached to glutathione columns. Their ability to bind MBP-Stau2⁶² in the presence or absence of RNase A was tested by western blotting. In contrast to GST that failed to pull-down MBP-Stau2⁶², the GST-hsc70 fusion protein was able to bring down MBP-Stau2⁶² even in the presence of RNase A (Fig. 3B). Similarly, MBP and MBP-Stau2⁶² were fixed to the SPR sensor chip surface. Then GST and GST-hsc70 were flowed over the SPR chip surface and their interaction with the immobilized proteins was monitored in real time. The resulting sensorgrams indicate that a direct interaction occurred between GST-hsc70 and MBP-Stau2⁶² even in the presence of

RNase A (Fig. 3C). These *in vitro* binding studies confirm the ability of hsc70 to interact with Stau2, independent of RNA.

ATP modulates the interaction between hsc70 and Stau2⁶²

hsc70 contains two functional domains, an N-terminal ATPase domain that contains the ATP/ADP-binding site and a C-terminal peptide-binding domain that contains the substrate-binding pocket (Frydman 2001). Upon ATP binding and hydrolysis a conformational change is induced in the ATPase domain (Jiang, Prasad et al. 2005; Mayer and Bukau 2005) that modifies the structure of the substrate binding domain and consequently modulates its ability to bind substrates. In its ATP bound form, hsc70 binds and releases substrates quickly, while, in the ADP bound state, substrate binding and release are slow (Schmid, Baici et al. 1994; Greene, Zinner et al. 1995). Therefore, we next tested whether the Stau2⁶²/hsc70 association is sensitive to the presence of ATP. To this end, the co-immunoprecipitation experiment (Fig. 4A) and the SPR experiment (Fig. 4B) were reproduced in the presence of 10 mM ATP. In both cases, the presence of ATP almost completely abolished the Stau2⁶²/hsc70 interaction.

Co-localisation of Stau2 isoforms with YB1 and PABPC1 in dendrites of hippocampal neurons

Altogether, our data suggest that we have isolated Stau2-containing mRNA particles, a sub-population of all Stau2-associated complexes in brains (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003), and that these mRNPs contain YB1, PABPC1 and/or hsc70. To determine whether these proteins can also be detected in the large granule complexes that are visible in dendrites, embryonic hippocampal neurons were first transfected with

plasmids coding for PABPC1-myc, YB1-CFP, hsc70-CFP or hnRNP H1-myc and fixed. Tagged-proteins and endogenous Stau2 were detected with anti-myc or anti-GFP and anti-Stau2 antibodies, respectively (Fig. 5). In addition to their presence in the cell bodies, PABPC1-myc (Fig. 5A) and YB1-CFP (Fig. 5B) can be found as puncta in dendrites (Fig. 5A). Only a very small fraction of these puncta also stained with antibodies that recognized endogenous Stau2. This suggests that PABPC1 and YB1 are not components of the large Stau2-containing complexes in dendrites. Similarly, hsc70-CFP was homogeneously distributed in the cell body and dendrites and did not form observable puncta (Fig. 5C). Therefore, it is suggested that its association with Stau2 may occur outside the large dendritic RNP complexes. Finally, hnRNP H1-myc was strictly nuclear (Fig. 5D), indicating that, if confirmed, Stau2/hnRNP H1 association would be restricted to the nucleus.

The reverse experiment was also done. Hippocampal neurons were transfected with Stau2⁶²-HA₃ and its co-localization with endogenous PABPC1 (Fig. 6A) and YB1 (Fig. 6B) was analyzed with specific antibodies. In these conditions, PABPC1 partly co-localized with Stau2⁶²-HA₃ whereas YB1 displayed only a weak co-localization. Altogether, our results suggest that PABPC1, YB1, hsc70 and hnRNP H1 may be mostly associated with Stau2 in small mRNPs and mainly absent in the large Stau2-containing mRNA granules in dendrites.

DISCUSSION

Stau2 is an RNA-binding protein mainly expressed in brain (Duchaine, Hemraj et al. 2002) and its importance for mRNA transport in dendrites (Tang, Meulemans et al. 2001; Jeong, Nam et al. 2007) and synaptic functions (Goetze, Tuebing et al. 2006) has been established. As a further step aiming to define its molecular functions in neurons and the mechanisms of regulation of Stau2-mediated mRNA transport and translation, we determined the molecular composition of Stau2-containing mRNPs. The absence of ribosomal proteins in the proteomics suggests that Stau2-containing particles have been characterized. They mainly contain components of the microtubules and RNA-binding proteins. While PABPC1, YB1 and hsc70 are clearly associated with Stau2-mRNPs, the presence of hnRNP H1 in these complexes is still unclear. It is possible that hnRNP H1 only transiently interacts with Stau2 in the nucleus and/or that it specifically associates with Stau2⁵⁶ or Stau2⁵² isoform(s). Alternatively, hnRNP H1 may be a false positive hit in the proteomics. However, hnRNP H1 has previously been identified in polysome-free poly(A)-bound mRNA complexes (Angenstein, Evans et al. 2005) and in embryonic RNA granules (Elvira, Wasiak et al. 2006) suggesting that it is a component of at least some mRNPs.

Post-transcriptional regulation of gene expression relies on a highly heterogeneous population of mRNP particles that ensure proper mRNA processing during splicing, nuclear trafficking, cytoplasmic localization, translation and/or decay (Keene and Tenenbaum 2002; Keene and Lager 2005). The differential presence/absence of RNA-binding proteins and other cofactors in each mRNP determines the roles of each mRNP complex in cellular functions and the fate of associated mRNAs. They may also form organized domains such as nuclear speckles, P-bodies or stress granules that are visible under the microscope when using specific markers (Misteli, Caceres et al. 1997; Parker and Sheth 2007; Buchan and Parker 2009). In dendrites of neurons, large ribonucleoprotein complexes shown to be associated with membranes and/or ribosomes can also be observed

(Mallardo, Deitinghoff et al. 2003; Kiebler and Bassell 2006; Sossin and DesGroseillers 2006). Our results at the biochemical and cellular levels are consistent with the possibility that we have isolated and characterized Stau2-containing ribosome-free mRNPs. A minor population of soluble, ribosome-free Stau2-containing complexes was already described in neurons (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). This population contained all differentially spliced Stau2 isoforms and was enriched with RNAs (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003). Accordingly, in a parallel approach, we also isolated mRNAs from the immunoprecipitated Stau2-containing mRNPs indicating that the proteomically identified proteins are components of complexes that also contain mRNAs (Maher-Laporte and DesGroseillers). The role of Stau2 and of its protein partners on the fate of associated mRNAs is still unclear. The presence in the proteomics of a nuclear protein (hnRNP H1), a protein and mRNA chaperone also involved in nuclear import/export (hsc70) and proteins that regulate translation initiation (PABPC1 and YB1) suggests that the isolated Stau2-containing mRNPs may be those involved in mRNP formation in the nucleus and/or in post-transcriptional regulation of bound mRNAs (see below). Stau2 was shown to be involved in mRNA transport in cellular processes (Tang, Meulemans et al. 2001; Mallardo, Deitinghoff et al. 2003; Kim and Kim 2006; Jeong, Nam et al. 2007), and based on known functions of its paralog Stau1, it might also be implicated in the control of mRNA stability or translation (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005; Kim, Furic et al. 2005).

Interestingly all Stau2-associated proteins except RUFY3 were previously described in different mRNPs. Indeed, α - and β -tubulin, YB1, PABPC1, hsc70 and hnRNP H1, as well as Stau2, were all present in the heterogeneous populations of mRNA granules isolated from embryonic rat brains (Elvira, Wasiak et al. 2006). Different combinations of the proteins were also described in other mRNPs (Bannai, Fukatsu et al. 2004; Angenstein, Evans et al. 2005; Jonson, Vikesaa et al. 2007). However, they are not universal components of all mRNPs since they were not identified in RNA granules isolated from post-natal rat brains (Kanai, Dohmae et al. 2004) and only PABPC1 and tubulins were found in Stau1-containing mRNPs (Brendel, Rehbein et al. 2004; Villace, Marion et al.

2004) suggesting that they play specialized roles for the transport and translation of specific mRNAs. In contrast, RUFY3 is specific to Stau2-containing mRNPs. This poorly characterized protein is expressed in brain and peaks around post-natal day 4. It accumulates in growth cones of minor processes and axons. Down-regulation of RUFY3 expression by RNAi leads to an increase in the population of neurons bearing surplus axons (Mori, Wada et al. 2007). Its molecular function and its role within RNPs are completely unknown.

One of the fundamental questions in the field is how mRNA translation is repressed during transport and reactivated in response to cell needs. It is believed that mRNA transport particles are translationally repressed at the level of initiation whereas ribosome-associated granules are kept silent during elongation (Sossin and DesGroseillers 2006). Accordingly, our proteomic results on Stau2-containing RNPs identified YB1 and PABPC1, two proteins known to modulate translation through interaction with initiation factors, as prominent candidates to fulfill translational regulation. YB1 is known to play key roles in cap-dependent mRNA stabilization (Evdokimova, Ruzanov et al. 2001) and translation (Nekrasov, Ivshina et al. 2003; Evdokimova, Ovchinnikov et al. 2006). It is viewed as a general translational repressor that maintains mRNPs in a translationally silent state by its ability to bind the 5' cap structure thus displacing the initiation factors eIF4E and eIF4G from these mRNAs (Evdokimova, Ruzanov et al. 2001; Nekrasov, Ivshina et al. 2003). Interestingly, YB1 can be phosphorylated by the Akt kinase (Sutherland, Kucab et al. 2005; Evdokimova, Ruzanov et al. 2006), the Rsk1/2 kinase and PKC alpha (Stratford, Fry et al. 2008). Its phosphorylation by the Akt kinase specifically diminishes its interaction with the capped 5' mRNA terminus reducing its ability to inhibit cap-dependent translation. Therefore, upon activation of a signalling pathway, phosphorylation of YB1 would be an efficient mechanism to modulate local translation of Stau2-bound mRNAs in neurons. Similarly, PABPC1 is involved in both activation and repression of translation at the level of initiation. By binding simultaneously to the poly(A) tail of mRNAs and to the initiation factor eIF4G, PABPC1 facilitates the formation of the closed loop structure that

facilitates translation. PABPC1 is also involved in translation inhibition by repressors (Mazumder, Seshadri et al. 2001). Indeed, poly(A) tail, PABPC1 and eIF4G are all required to allow the translational inhibition of the ceruloplasmin transcript by the IFN-gamma-activated inhibitor of translation (GAIT) repressor. Similarly, PABPC1 is involved in the translational repression of its own transcript by binding an adenine-rich autoregulatory sequence (ARS) in the 5'-untranslated region (Patel, Ma et al. 2005). It also binds with lower affinities to a non-poly(A) cis-acting dendritic localizer sequence in the vasopressin mRNA (Mohr, Prakash et al. 2001; Mangus, Evans et al. 2003; Patel, Ma et al. 2005). In addition to their roles in translation, both YB1 (Chernov, Mechulam et al. 2008) and PABPC1 (Chernov, Curmi et al. 2008) strongly bind tubulins. The association between YB1 and tubulin is believed to interfere with mRNA binding thus reducing the YB1/mRNA ratio and facilitating translation. Considering that Stau2 mRNPs are transported on microtubules in dendrites and that both α - and β -tubulin were found in the proteomics, the presence of YB1 and PABPC1 in Stau2-containing mRNPs may contribute to the control of mRNA translation activation by regulating mRNA accessibility.

Another proteomically identified protein is hsc70. Hsc70 has a chaperone activity driven by cycles of ATP/ADP bound states (Mayer and Bukau 2005). It could be an important factor for Stau2 folding, thus enabling it to bind mRNAs and/or other protein partners. It may also more directly influence mRNA metabolism and/or translation through its ability to modulate the folding of mRNA (Henics, Nagy et al. 1999) and to stabilize mRNA via its binding to AU-rich sequences (Matsui, Asou et al. 2007). Interestingly, its mRNA binding activity is inhibited by the binding of ATP molecules that compete for the same protein domain (Henics, Nagy et al. 1999). We show in this paper that ATP binding also inhibits its interaction with Stau2 (Fig. 4) suggesting that hsc70 through ATP binding may regulate the release of mRNAs and/or control the dissociation of Stau2-containing RNPs. Releasing and/or destabilising mRNAs at precise moments during synaptic activity can finely tune protein expression at synapses. Hsc70 can play two additional important roles in mRNP transport. First, hsc70 is known to regulate the nuclear export/import

trafficking of several karyopherin family members (Shi and Thomas 1992; Kose, Furuta et al. 2005). Therefore, it could be an important factor for the nuclear shuttling of Stau2 and/or nuclear exit of Stau2-containing mRNPs. However, its role in the trafficking of exportin-5 and CRM1 which are known to export Stau2 from the nucleus (Macchi, Brownawell et al. 2004; Miki and Yoneda 2004) has not yet been tested. Finally, hsc70 is important for the release of the molecular motor kinesin from its vesicular cargo permitting its precise localization (Tsai, Morfini et al. 2000). Stau2 mRNPs are transported on dendritic microtubules (Duchaine, Hemraj et al. 2002) and co-fractionate with tubulin and kinesin (Mallardo, Deitinghoff et al. 2003) making hsc70 an important candidate for the regulation of their transport. Altogether, these functions of hsc70, especially those related to protein and mRNA folding and to nuclear export/import, suggested that hsc70 is involved in mRNP formation and/or other early steps in the process of mRNA transport. This may explain why the presence of hsc70 in large Stau2-containing mRNA transport complexes in dendrites may not be required (Fig. 5).

In conclusion, our data suggest that we have characterized a heterogeneous population of Stau2-containing mRNPs from embryonic rat brain. Our study indicates that they are largely composed of proteins that are also components of other types of mRNPs. The biochemical characterization of Stau2-containing particles gives us new tools that will contribute to our understanding of mRNA transport in neurons and of its role in neurons.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Charles Rivers Canada. Our research involving animals has been conducted according to the guidelines of the Canadian Council of Animal Care (CCAC). Our project has been approved by the “Comité de déontologie de l’expérimentation sur les animaux” at the Université de Montréal.

Immunoprecipitation and immunoblotting

Rabbit polyclonal anti-Stau2 (Duchaine, Hemraj et al. 2002) and a mouse monoclonal (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005) anti-HA antibodies were used for immunoprecipitation. For immunoblotting, mouse monoclonal anti-Stau2 (Duchaine, Hemraj et al. 2002), rabbit polyclonal anti-HA (Sigma), goat anti-myc (Bethyl), goat anti-GST (Amersham Pharmacia Biotech), goat anti-GFP (Rockland), and rabbit anti-MBP (New England BioLabs, Inc) were used. For immunofluorescence in hippocampal neurons, rabbit polyclonal anti-Stau2 (a generous gift from Dr Michael Kiebler), anti-PABPC1 (Abcam) and anti-YB1 (Abcam) were used.

Immunoprecipitation of Stau2-containing mRNPs was performed on cell extracts prepared from whole brains of E17-E18 rat embryos. Cells were dissociated with a manual putter and lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 15 mM EGTA, 1 mM DTT and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were centrifuged at 9300g for 10 min to remove nuclei and cell debris. After centrifugation, supernatants were incubated with a rabbit polyclonal anti-Stau2 antibody (Duchaine, Hemraj et al. 2002) for 2 hours at 4°C, then with a 50% protein A-sepharose slurry for 2 hours at 4°C. Immune complexes were washed five times with the lysis buffer

and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in elution buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM DTT and 4% SDS). RNAs were isolated by Trizol (Invitrogen) extraction.

For the co-immunoprecipitation experiments, N2A cells were propagated in DMEM medium supplemented with 10% BSA serum (HyClone). Cells were co-transfected with plasmids coding for one of the following proteins: Stau2⁵⁹-HA₃ or Stau2⁶²-HA₃ (Elvira, Massie et al. 2006) and either hsc70-CFP, YB1-CFP, hnRNP H1-myc or PABPC1-myc using the calcium-phosphate technique. Cells were collected 48 h post-transfection. Immunoprecipitations were performed as above using a mouse monoclonal anti-HA antibody. Detection of the co-immunoprecipitated proteins was done by western blotting with either rabbit polyclonal anti-HA (Sigma), goat anti-Myc (Bethyl) or goat anti-GFP (Rockland) antibodies. To assess if the interaction was RNA dependent, cell extracts were incubated for 30 min at room temperature with 300 U (300 U/μl) of the Micrococcal Nuclease (Fermentas) in 1 mM CaCl₂ before adding the antibody.

Proteomic techniques

Proteomic techniques were essentially done as before (Elvira, Wasiak et al. 2006). Briefly, immunoprecipitation eluates were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue, and cut into 26 horizontal gel slices with each slice processed for in-gel trypsin digestion and peptide extraction. The extracted peptide mixtures were separated and analyzed in an automated system by nanoscale LC Q-TOF MS/MS. After fragmentation in the MS/MS mode, the resulting spectra were searched with Mascot (version 1.9.03; Matrix Science, London, UK) against a copy of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database (June 21st, 2004) restricted to the *Mammalia* taxonomy.

Protein co-localisation in hippocampal neurons

Primary hippocampal neurons were cultured on #1,5 coverslips as previously described (Banker and Goslin 1988; Elvira, Massie et al. 2006). On day 5, neurons were transfected with 2 µg of LipofectamineTM 2000 and 1 µg of plasmids coding for Stau2⁶²-HA₃, PABPC1-myc, hsc70-CFP, YB1-CFP, or hnRNP H1-myc as indicated in 100 µl of plain Neurobasal for 10 min. Neurons were fixed 24 hours later with PBS/PFA 4%, PFA was quenched with 1 M glycine in PBS/0.1% Triton X-100 for 10 min, blocked with 0.1% Triton X-100/2% BSA in PBS overnight at 4 °C. Neurons were incubated with goat anti-myc (1:400 Bethyl A190-104A), mouse anti-GFP (1:500, Roche) or anti-HA (1:3000, 12CA5) and rabbit anti-Stau2 (1:600, a generous gift from Dr Michael Kiebler), rabbit anti-PABP or anti-YB1 (1:200 and 1:250, Abcam ab21060 and ab12148, respectively) antibodies for 2h at room temperature, washed in PBS and stained with Alexa Fluor[®] 647 dyed donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and Alexa Fluor[®] 488 dyed donkey anti-mouse or anti-goat IgG antibodies (1:400, Invitrogen A31573, A21202 and A11055, respectively) for 1h. Coverslips were mounted on slides (Fisher) using Dako fluorescent mounting medium (Dako). Neurons were visualized under a Nikon E800 widefield microscope Plan Apo 100x N.A. 1.40 oil-immersion objective lens.

Protein expression and purification

Plasmids coding for GST-hsc70 and MBP-Stau2 were cloned into the pGEX (Amersham Pharmacia Biotech) and pMal-C (New England Biolabs) vectors, respectively. The fusion proteins were expressed in *E. coli* BL21 cells, following induction with IPTG for 2h. Proteins were collected in PBS/1mM DTT/1% Triton X-100/5 mM benzamidine at 4°C. GST-hsc70 and MBP-Stau2 proteins were purified on glutathione-Sepharose-4B and amylose affinity columns, respectively and eluted with 10 mM reduced glutathione in 50

mM tris-HCl (pH 8.0) or 10 mM of D-maltose in PBS, respectively. For some experiments, lysates were treated with 50 µg/ml RNase A for 1h at 4°C before column purification. Protein purification was monitored by SDS-PAGE. Proteins were detected by zinc staining and/or western blotting experiments.

GST-pull down assay

Bacterially expressed and purified GST and GST-hsc70 proteins were attached to glutathione columns. MBP-Stau2 or MBP were loaded onto the columns, extensively washed and eluted as recommended by the manufacturer. Eluted proteins were analyzed by western blotting using anti-GST and anti-MBP antibodies. For some experiments, protein extracts were treated with 50 µg/ml RNase A for 1h at 4°C before loading onto the columns.

Surface plasmon resonance (SPR) binding assay

Binding interactions between purified MBP-Stau2 and GST-hsc70 were examined in real time using a BIACORE 2000 instrument (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upssala, Sweden). Experiments were performed on research-grade CM5 sensor chip at 25°C using filtered (0.2 µm) and degassed HBS-EP [10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) Surfactant P20]. Protein-grade detergents [10% (v/v) Tween-20, 10% (v/v) DDM] were from Calbiochem; all other chemicals were reagent grade quality. Immobilized sensor chip surfaces were prepared using the Biacore amine Coupling Kit. Briefly, 35 µl of a freshly mixed solution of 200 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide and 50 mM N-hydroxysuccinimide was injected (at a flow rate of 5 µl min⁻¹) to activate surface-exposed carboxymethyl groups into reactive esters. Next, 120 µl of

MBP-Stau2 diluted to $70 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 10 mM sodium acetate pH 4.0 was injected (at a flow rate of $10 \mu\text{l min}^{-1}$) to generate amine-coupled protein surfaces. Finally, $70 \mu\text{l}$ of 1 M ethanolamine pH 8.5 was injected to deactivate excess reactive groups and remove any non-specifically bound ligand. A reference surface was prepared in a similar manner with purified MBP. To test binding, purified GST-hsc70 ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) or GST (negative control) were injected over the coupled surfaces at $10 \mu\text{l min}^{-1}$ (3 min association time and 2.5 min dissociation time). For all SPR assays, the surfaces were regenerated between sample injections at $50 \mu\text{l min}^{-1}$ with a 30 s single pulse of 0.4 M NaCl followed by a stabilization time after regeneration of 3 min. The assays were performed in duplicates with different batches of purified proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Louise Cournoyer for her help with tissue cultures and Génome Québec, Réseau Protéomique de Montréal, Montreal Proteomics Network (RPMPN) for mass spectrometry and analysis.

REFERENCES

1. Bassell GJ, Oleynikov Y, Singer RH (1999) The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB Journal* 13: 447-454.
2. Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51: 685-690.
3. Sossin WS, DesGroseillers L (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7: 1581-1589.
4. Sanchez-Carbente M, DesGroseillers L (2008) Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169: 41-58.
5. Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, et al. (2008) Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28: 2896-2907.
6. Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, et al. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2100-2105.
7. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, et al. (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115: 3285-3295.
8. Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E (2001) A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32: 463-475.
9. Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, et al. (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 172: 221-231.
10. Macchi P, Brownawell AM, Grunewald B, DesGroseillers L, Macara IG, et al. (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar

- accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem* 279: 31440-31444.
11. Monshausen M, Gehring NH, Kosik KS (2004) The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular Med* 6: 127-144.
 12. Elvira G, Massie B, DesGroseillers L (2006) The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96: 105-117.
 13. Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 70: 603-647.
 14. Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* 20: 513-524.
 15. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684.
 16. Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263: 971-973.
 17. Greene LE, Zinner R, Naficy S, Eisenberg E (1995) Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 270: 2967-2973.
 18. Jeong JH, Nam YJ, Kim SY, Kim EG, Jeong J, et al. (2007) The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* 102: 2073-2084.
 19. Angenstein F, Evans AM, Ling SC, Settlage RE, Ficarro S, et al. (2005) Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 280: 6496-6503.
 20. Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, et al. (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5: 635-651.

21. Keene JD, Lager PJ (2005) Post-transcriptional operons and regulons co-ordinating gene expression. *Chromosome Res* 13: 327-337.
22. Keene JD, Tenenbaum SA (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9: 1161-1167.
23. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36: 932-941.
24. Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-646.
25. Misteli T, Caceres JF, Spector DL (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387: 523-527.
26. Maher-Laporte M, DesGroseillers L Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains. *BMB Rep* 43: 344-348.
27. Kim KC, Kim HK (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* 397: 48-52.
28. Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120: 195-208.
29. Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, et al. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33: 4797-4812.
30. Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, et al. (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* 6: 798-811.
31. Bannai H, Fukatsu K, Mizutani A, Natsume T, Iemura S, et al. (2004) An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J Biol Chem* 279: 53427-53434.
32. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43: 513-525.

33. Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, et al. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384: 239-246.
34. Villace P, Marion RM, Ortin J (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32: 2411-2420.
35. Mori T, Wada T, Suzuki T, Kubota Y, Inagaki N (2007) Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity. *J Biol Chem* 282: 19884-19893.
36. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, et al. (2001) The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *Embo J* 20: 5491-5502.
37. Nekrasov MP, Ivshina MP, Chernov KG, Kovrigina EA, Evdokimova VM, et al. (2003) The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem* 278: 13936-13943.
38. Evdokimova V, Ovchinnikov LP, Sorensen PH (2006) Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle* 5: 1143-1147.
39. Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, et al. (2006) Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26: 277-292.
40. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MC, et al. (2005) Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 24: 4281-4292.
41. Stratford AL, Fry CJ, Desilets C, Davies AH, Cho YY, et al. (2008) Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10: R99.

42. Mazumder B, Seshadri V, Imataka H, Sonenberg N, Fox PL (2001) Translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A)-binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 21: 6440-6449.
43. Patel GP, Ma S, Bag J (2005) The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* 33: 7074-7089.
44. Mangus DA, Evans MC, Jacobson A (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4: 223.
45. Mohr E, Prakash N, Vieluf K, Fuhrmann C, Buck F, et al. (2001) Vasopressin mRNA localization in nerve cells: characterization of cis-acting elements and trans-acting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7072-7079.
46. Chernov KG, Mechulam A, Popova NV, Pastre D, Nadezhdina ES, et al. (2008) YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules. *BMC Biochem* 9: 23.
47. Chernov KG, Curmi PA, Hamon L, Mechulam A, Ovchinnikov LP, et al. (2008) Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP. *FEBS Lett* 582: 2875-2881.
48. Henics T, Nagy E, Oh HJ, Csermely P, von Gabain A, et al. (1999) Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem* 274: 17318-17324.
49. Matsui H, Asou H, Inaba T (2007) Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* 25: 99-112.
50. Kose S, Furuta M, Koike M, Yoneda Y, Imamoto N (2005) The 70-kD heat shock cognate protein (hsc70) facilitates the nuclear export of the import receptors. *J Cell Biol* 171: 19-25.

51. Shi Y, Thomas JO (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12: 2186-2192.
52. Miki T, Yoneda Y (2004) Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem* 279: 47473-47479.
53. Tsai MY, Morfini G, Szebenyi G, Brady ST (2000) Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 11: 2161-2173.
54. Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336: 185-186.
55. Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, Sorokin AV, Dubrovin EV, et al. (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res* 32: 5621-5635.
56. Matunis MJ, Xing J, Dreyfuss G (1994) The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization. *Nucleic Acids Res* 22: 1059-1067.
57. Lewis SA, Cowan N (1990) Microtubule bundling. *Nature* 345: 674.

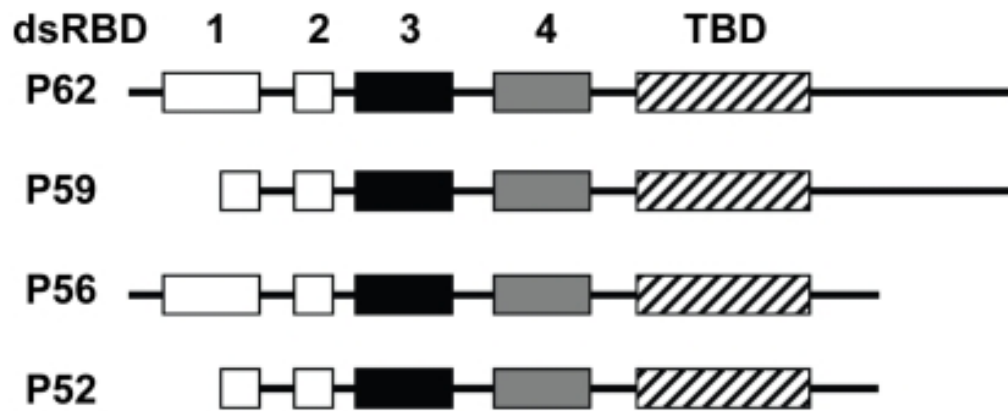
FIGURES AND LEGENDS

FIGURE 1: Immunoprecipitation of Stau2 isoforms.

(A) Schematic representation of Stau2 isoforms. The *Stau2* gene generates four different isoforms of 62, 59, 56 and 52 kDa through differential splicing. Black, grey and white boxes represent double-stranded RNA-binding (dsRBD) consensus sequence having full, partial or no RNA-binding activity, respectively. Hatched boxes represent the tubulin-binding domain (TBD). (B) Immunoprecipitation of Stau2 isoforms from embryonic E17-18 rat brain extracts using two different polyclonal anti-Stau2 antibodies, L1 (St2-L1) and L2 (St2-L2). The specificity of these antibodies was previously reported (Duchaine, Hemraj et al. 2002). Pre-immune (PI) sera were used as controls. The Stau2⁵⁶ isoform is not visible in these cell extracts. * represents a non-specific IgG band.

FIGURE 1

A



B

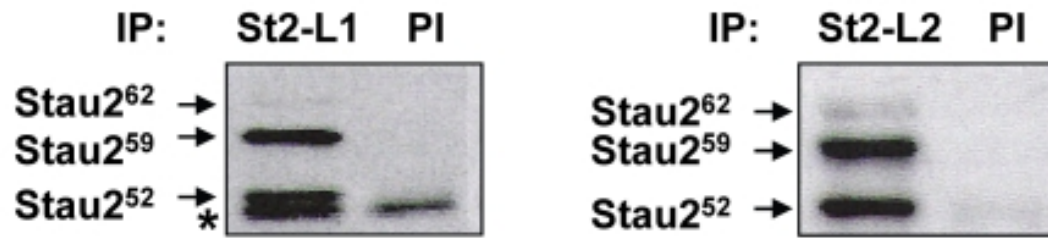


FIGURE 2: RNA-binding proteins are associated with Stau2 isoforms in mRNPs.

N2A cells were mock transfected (--) or co-transfected with plasmids coding for either Stau2⁵⁹-HA₃ (59) or Stau2⁶²-HA₃ (62) and plasmids coding for PABPC1-myc (**A**), YB1-CFP (**B**), hsc70-CFP (**C**) or hnRNP H1-myc (**D**) as indicated. Immunoprecipitation of Stau2-containing RNPs was performed with anti-HA antibody and the proteins detected on western blots using anti-HA, anti-myc or anti-GFP antibodies as needed. The experiments were done in the absence (-RNase) or presence (+RNase) of Micrococcal nuclease to determine if the Stau2-protein association requires an RNA bridge. These results were representative of at least three experiments. Input (INPUT) of transfected proteins before immunoprecipitation is also shown to indicate that the tagged-proteins were well expressed in these cells.

FIGURE 2

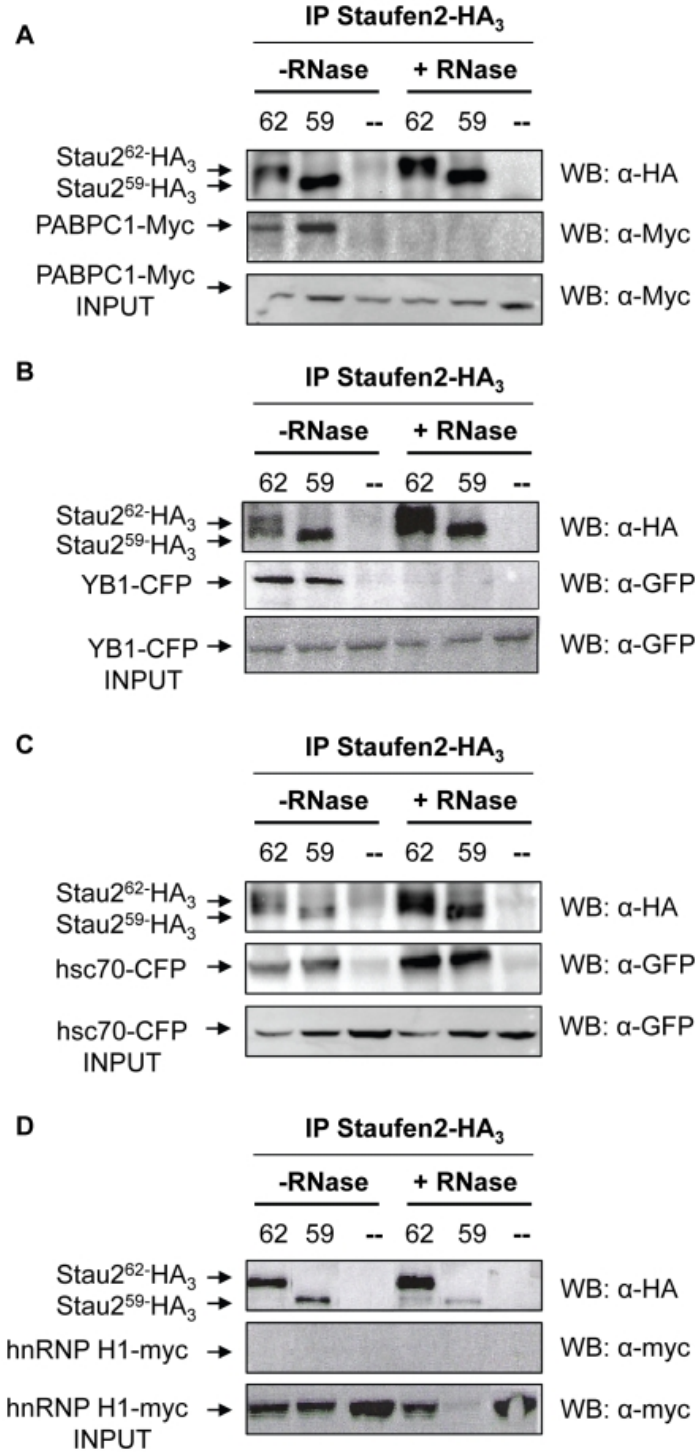


FIGURE 3: MBP-Stau2⁶² binds GST-hsc70 through protein-protein interaction.

To confirm the RNA-resistant interaction between Stau2 and hsc70, bacterially expressed proteins were purified **(A)** and GST-pull down **(B)** and surface plasmon resonance SPR **(C)** assays were performed in the presence or absence of RNase A. **(A)** MBP-Stau2⁶², MBP, GST-hsc70 and GST were purified on amylose and glutathione-Sepharose-4B affinity columns, respectively, and eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining. **(B)** GST and GST-hsc70 were fixed on a glutathione-Sepharose-4B affinity column and MBP-Stau2⁶² was loaded in the presence (+) or absence (-) of RNase A. After several washing, proteins were eluted from the columns and detected by western blotting using anti-Stau2 and anti-GST antibodies, respectively. **(C)** MBP and MBP-Stau2⁶² were immobilized on different lanes of a SPR sensor chip. GST-hsc70 or GST were injected for 3 minutes over the surfaces in the presence or absence of RNase and then buffer alone was injected for 2.5 min to monitor protein dissociation rate. The resulting resonance units (RU) were measured during the association and dissociation phases. The baseline obtained with the MBP-coupled reference surface was subtracted from the sensorgram obtained from the MBP-Stau2⁶²-coupled surface and a typical result is shown.

FIGURE 3

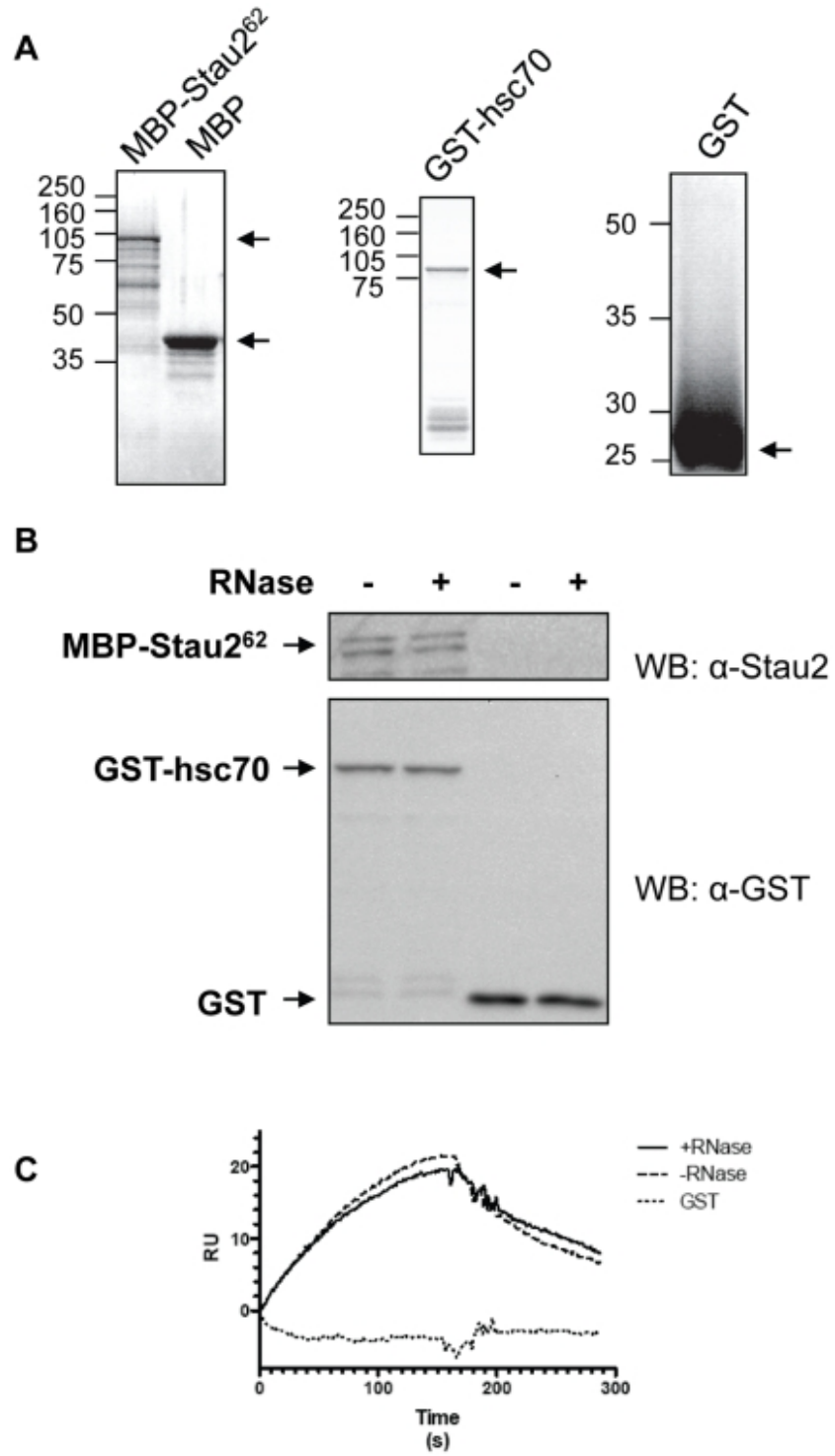


FIGURE 4: The interaction between Stau2⁶² and hsc70 is abolished in the presence of ATP.

(A) N2A cells were co-transfected with plasmids coding for Stau2⁶²-HA₃ and hsc70-CFP as done for figure 2. Immunoprecipitation of Stau2-containing RNPs was performed with anti-HA antibody and the proteins detected on western blots using anti-HA or anti-GFP antibodies as needed. The experiment was done in the absence (-) or presence of either Micrococcal nuclease (+RNase) or ATP (+ATP). These results are representative of at least three experiments. **(B)** As done for figure 3C, MBP and MBP-Stau2⁶² were immobilized on different lanes of a SPR sensor chip. GST-hsc70 or GST was injected for 3 minutes over the surfaces in the presence or absence of ATP. The baseline obtained with the MBP-coupled reference surface was subtracted from the sensorgram obtained from the MBP-Stau2⁶²-coupled surface and a typical result is shown.

FIGURE 4

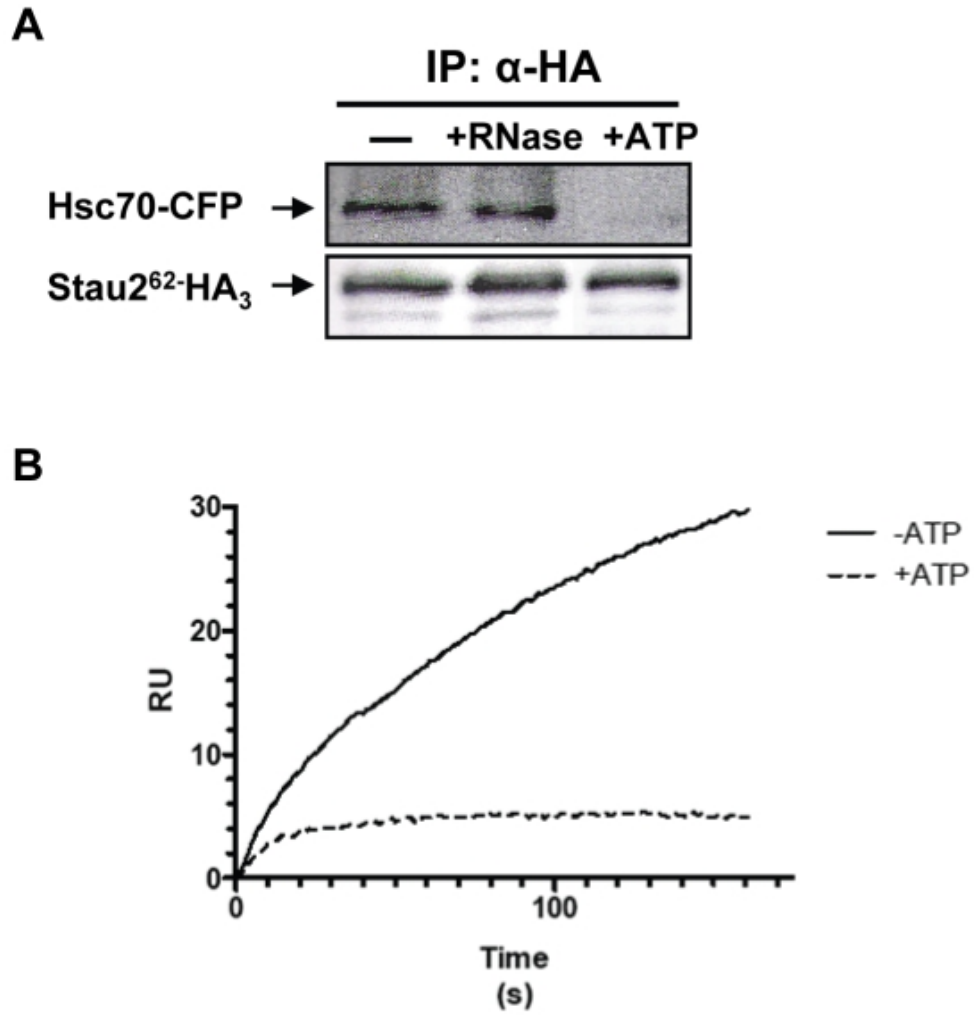


FIGURE 5: Co-localization of endogenous Stau2 with PABPC1-myc, YB1-CFP, hsc70-CFP and hnRNP H1-myc in hippocampal neurons.

Neurons were transfected with plasmids coding for either PABPC1-myc (**A**), YB1-CFP (**B**), hsc70-CFP (**C**) or hnRNP H1-myc (**D**). Twenty four hours post-transfection, neurons were fixed and labeled with anti-myc or anti-GFP (green) and anti-Stau2 (red) antibodies.

Left: Fluorescence microscopy of hippocampal neurons in culture. Scale bars: 5 μm .

Right: Higher magnification of images showing protein localization in dendrites. The lower panels represent the superposition of both green and red signals. Scale bars: 2 μm .

FIGURE 5

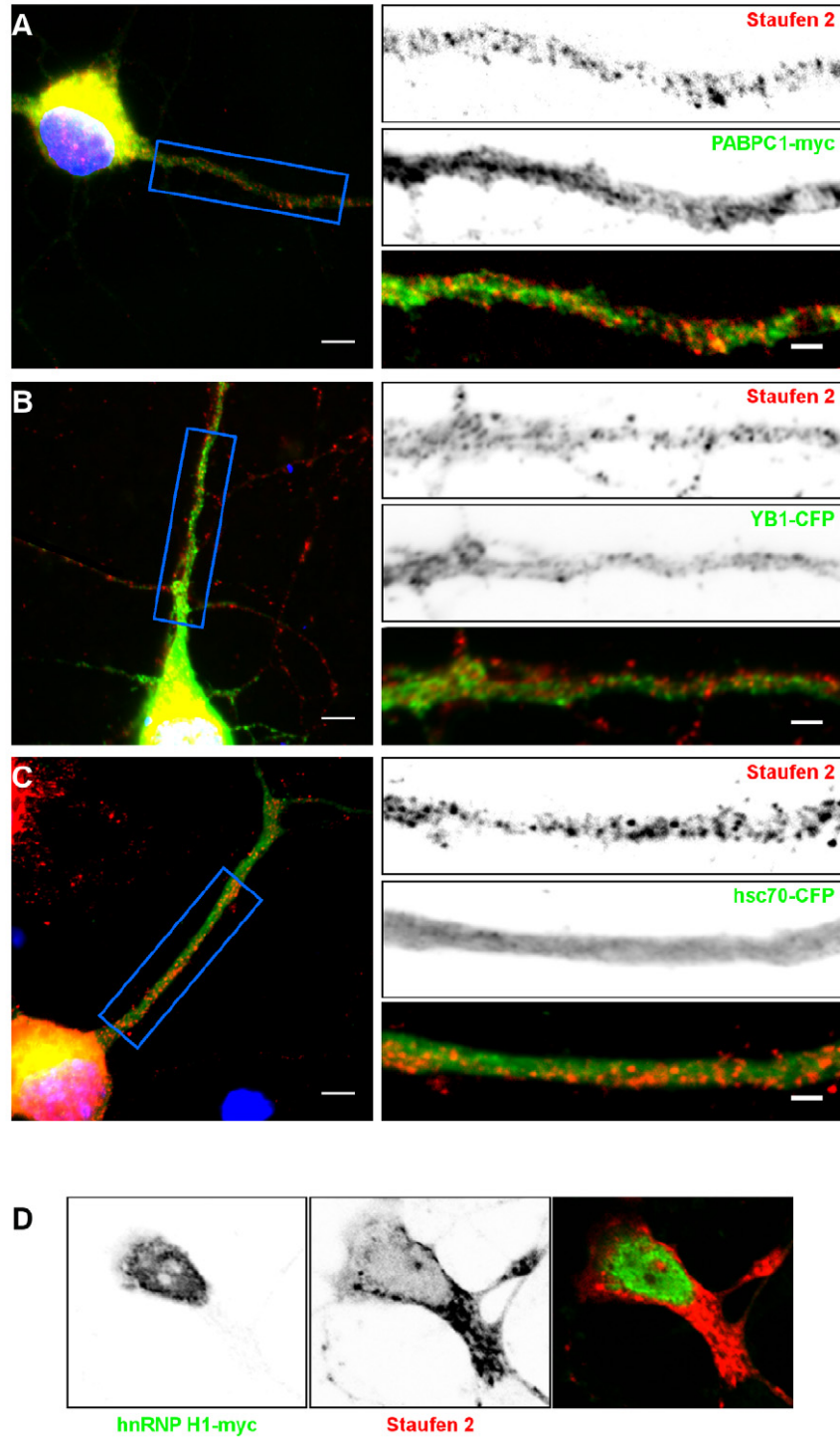


FIGURE 6 : Co-localization of Stau2⁶²-HA₃ with endogenous PABPC1 and YB1 in hippocampal neurons.

Neurons were transfected with a plasmid coding for Stau2⁶²-HA₃. Twenty four hours post-transfection, neurons were fixed and labeled with anti-HA antibody (red) and either anti-YB1 (**A**) or anti-PABPC1 (**B**) antibodies (green). **Left**: Fluorescence microscopy of hippocampal neurons in culture. Scale bars: 5 μ m. **Right**: Higher magnification of images showing protein localization in dendrites. The lower panels represent the superposition of both green and red signals. Scale bars: 2 μ m.

FIGURE 6

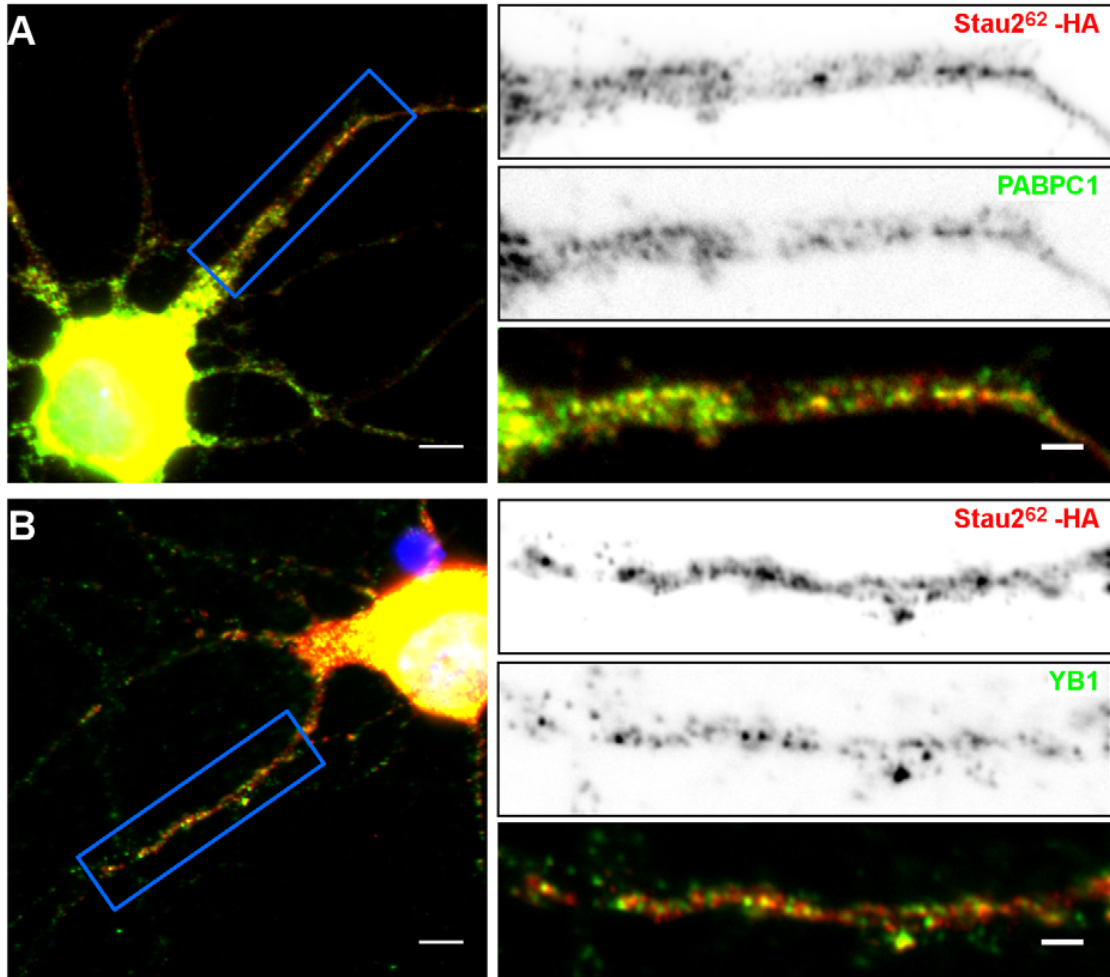


TABLE 1 : Proteomically identified proteins in Stau2-containing mRNPs.

Name	Peptides	Description/function	References
Staufen 2	12	Double-stranded RNA-binding protein. Mainly involved in mRNA transport	[7]
PABPC1	7	Polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1. Mainly involved in the regulation of translation	[44]
YB1	3	Y-box 1 RNA-binding protein. Mainly involved in the regulation of translation	[36]; [55]
Hsc70	3	heat-shock cognate RNA-binding protein 70. Involved in nuclear trafficking, RNA chaperone, kinesin-mediated transport	[49]; [48]; [53]
hnRNP H1	1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1. Poly(rG)-RNA-binding protein	[56]
α -tubulin (1A, 1B)	5	Component of microtubule	[57]
β -tubulin (2b)	12	Component of microtubule	[57]
RUFY3	10	Protein interacting with rap2. Role in axonogenesis	[35]

doi:10.1371/journal.pone.0011350.t001

DISCUSSION

Cette thèse s'intéresse aux différents complexes ribonucléoprotéiques des paralogues et isoformes de la protéine Staufen. Nous avons préalablement établi que Stau1 et Stau2 faisaient partie de complexes ribonucléoprotéiques distincts, tout comme les isoformes Stau2⁵⁹ et Stau2⁶². Les résultats présentés dans cette thèse poussent davantage la comparaison grâce à l'identification de populations d'ARNm spécifiquement associées à chacun de ces isoformes. La découverte des ARNm associés à Stau constitue en soi une avancée importante, car très peu de ligands furent préalablement identifiés. Plus particulièrement, nous avons caractérisé des particules de transport contenant Stau2. Nous avons identifié, à partir de cerveaux d'embryons de rat, les ARNm associés de même que de nouveaux partenaires protéiques potentiels de Stau2. Nos résultats suggèrent une association directe entre Stau2⁶² et hsc70, interaction modulée par la liaison de cette dernière à l'ATP, et un mécanisme de régulation de la traduction des ARNm liés, par la présence des facteurs YB1 et PABPC1. Enfin, nous avons mis en lumière l'importance de la localisation des mRNP de Stau1 dans la morphologie des épines dendritiques ainsi qu'au niveau de la plasticité synaptique.

Approche utilisée dans l'identification des populations d'ARNm associées à Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²

Stau1 est retrouvée sous forme de trois isoformes, lesquels ayant des rôles et des distributions distinctes, soit Stau1⁵⁵, Stau1⁶³ et Stau1ⁱ (Wickham, Duchaine et al. 1999) (Duchaine, Wang et al. 2000). De même, Stau2 génère quatre isoformes, Stau2⁶², Stau2⁵⁹, Stau2⁵⁶ et Stau2⁵², ayant également leurs particularités (Duchaine, Hemraj et al. 2002; Monshausen, Gehring et al. 2004)(Tang, Meulemans et al. 2001). Malgré ces caractéristiques propres à chacun, il existe, de façon générale, une identité de séquence de 51% entre Stau1 et Stau2. Ce pourcentage augmente considérablement, soit à 77%, lorsque l'on compare les séquences du dsRBD3, principal domaine de liaison à l'ARN. Encore

plus évocateur, la seule distinction entre Stau2⁶² et Stau2⁵⁹ se situe au niveau de leur extrémité N-terminale.

À partir de ces informations, deux grandes hypothèses furent avancées. La première suppose que, comme ces protéines sont très semblables au niveau de leur domaine de liaison à l'ARN, chaque isoforme se retrouve associé à la même population d'ARNm, et ce qui les distingue se révèle lors de la régulation fine de chacune d'elle. Par exemple, au moment de l'activation post-traductionnelle d'un isoforme plutôt qu'un autre par l'action d'une voie de signalisation spécifique. La deuxième suggère plutôt que, comme chaque isoforme est particulier et possède une distribution subcellulaire spécifique, cela lui confère la faculté de lier une population d'ARNm uniques.

Nous avons donc voulu aborder cette problématique intéressante. Pour ce faire, nous avons décidé d'identifier, grâce à la technologie des micropuces d'ADN, les ARNm présents dans les mRNP de Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA, et Stau2⁶²-HA. Nous avons donc immunoprécipité chaque isoforme, puis isolé les ARNm présents dans l'immunoprécipité. Nous avons choisi d'utiliser ces trois isoformes, car leur distribution subcellulaire distincte est la mieux décrite dans la littérature. En espérant pouvoir définir encore mieux le rôle de chacun de ces isoformes au sein de la cellule, nous avons également cherché à savoir à quelles voies métaboliques appartenaient ces ARNm.

Mentionnons que plusieurs études avaient démontré de façon directe ou non l'association de Stau avec certains ARNm. De plus, une première expérience, dont nous avons fait mention et mise sur pied dans le laboratoire, avait permis d'identifier 23 ARNm potentiellement associés à Stau1⁵⁵ dans les complexes présents au niveau des HEK293T (Kim, Furic et al. 2005). Cependant, aucune approche d'identification à large échelle n'avait encore été entreprise afin d'identifier et de comparer les populations d'ARNm présentes dans les mRNP de Stau1 avec celles présentes dans les mRNP des différents isoformes de Stau2.

Ainsi, nous avons hybridé, sur les puces d’Affymetrix, les transcrits recueillis à la suite de deux à quatre immunoprécipitats, selon l’isoforme étudié. Notons que 37.3% des gènes représentés sur la puce sont exprimés dans les cellules utilisées, les cellules HEK293T. Grâce à une analyse statistique non-pairée, nous avons conservé les ARNm, dont les résultats statistiques étaient reproductibles, en choisissant un P-value de 0.05. Puis, nous avons considéré comme positifs les ARNm dont le signal était 2,5 fois supérieur à ceux de l’IP contrôle.

Identification des populations communes et distinctes d’ARNm au sein des mRNP de Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶²

Nous avons déterminé dans un premier temps que 7% des gènes exprimés dans les cellules HEK293T étaient associés à Stau1⁵⁵-HA, 12% à Stau2⁵⁹-HA et 10% à Stau2⁶²-HA. Nos résultats démontrèrent qu’en effet, une population commune d’ARNm était liée par Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶², soit 368 transcrits. La similarité de séquence entre ces isoformes peut facilement expliquer le fait que ces transcrits soient retrouvés au sein de ces trois complexes.

Cependant, nous avons également pu observer que des populations spécifiques d’ARNm étaient liées par chacun de ces isoformes. En effet, en analysant davantage ces populations d’ARNm, nous avons pu remarquer que les ARNm identifiés avec Stau1⁵⁵-HA étaient spécifiques à celle-ci à 63% et 58% lorsqu’ils étaient comparés avec ceux retrouvés dans les IP Stau2⁶²-HA et Stau2⁵⁹-HA, respectivement. En combinant ces résultats, il s’agit de 49% des ARNm identifiés dans l’IP de Stau1⁵⁵-HA qui sont uniques à Stau1. En regardant sous un autre angle, nous pouvons également affirmer que 75% et 74% des ARNm identifiés avec Stau2⁵⁹-HA et Stau2⁶²-HA, respectivement, ne sont pas retrouvés avec Stau1⁵⁵-HA.

De même, lorsque l'on compare les ARNm présents dans les IP de Stau2⁶²-HA et Stau2⁵⁹-HA, il existe des populations communes et spécifiques d'ARNm. Il est intéressant de constater que cette population commune d'ARNm est beaucoup plus grande entre ces isoformes qu'elle ne l'était entre Stau1 et Stau2. Ce résultat est en accord avec la plus grande similarité de séquence entre celles-ci qu'avec Stau1. Ainsi, seuls 33% et 43% des ARNm sont spécifiquement associés à Stau2⁶²-HA et Stau2⁵⁹-HA, respectivement.

Donc, comme nous l'avions suggéré, il existe également une spécificité d'association entre certains transcrits et les différents isoformes de Staufen. Il est probable que la compartimentalisation et l'association de facteurs protéiques spécifiques à chaque isoforme favorisent la liaison de ceux-ci avec une population distincte d'ARNm.

Nous avons ensuite confirmé la présence de certains de ces transcrits, au sein de leur mRNP respectif, par la technique de RT-PCR, et ce, toujours à partir des ARNm isolés suite à l'immunoprécipitation des isoformes Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁶²-HA et Stau2⁵⁹-HA.

Cependant, nous avons remarqué que certains transcrits qui, par micropuces d'ADN, avait été identifiés comme étant absents de l'un ou l'autre des mRNP, se retrouvaient maintenant enrichis dans ceux-ci lorsqu'ils étaient analysés par RT-PCR et comparés au contrôle. Il est possible que ces observations soient occasionnées par les limites de la technique ou la stringence de l'analyse à grande échelle. Il est également envisageable, d'une part, que ces ARNm fassent bel et bien partie de ces autres mRNP, toutefois, dans des concentrations moindres n'ayant pas permis à ceux-ci d'atteindre le seuil de sensibilité des micropuces. Ces transcrits seraient donc associés à plus d'un isoforme, mais avec différentes affinités. D'autre part, il ne faut pas perdre de vue la possibilité que la composition des granules puisse être partiellement hétérogène. Ainsi, les ARNm associés à Stau1, par exemple, pourraient se retrouver associés aux mRNP de Stau2 lorsque l'on immunoprécipite cette dernière. La RT-PCR étant plus sensible, nous pouvons alors détecter la présence de cet ARNm.

Enfin, nous avons réussi à confirmer la présence de certains de ces transcrits au sein des mRNP endogènes de Stau1 et Stau2.

Ces résultats sont très prometteurs. Cependant, il nous est impossible pour l'instant de déterminer si ces transcrits sont des cibles directes ou non de Stau. Ces études seront difficiles à réaliser puisque Stau ne possède aucune spécificité de liaison *in vitro* (Kiebler, Hemraj et al. 1999; Wickham, Duchaine et al. 1999). Rappelons-nous que les méthodes de réticulation à l'UV sont peu efficaces dans le cas des protéines qui lient l'ARN double-brin, car elles se lient au squelette phosphodiester de l'ARN et non au niveau des bases azotées, région de l'ARN permettant la réticulation avec la chaîne latérale de certains acides aminés (Liu, Wilkie et al. 1996). Il faudra donc procéder à l'étude de l'association entre Stau2 et de nombreux mutants d'ARN afin de confirmer et déterminer une région d'association. Tout comme il en avait été question lors de la détermination du SBS, dans le transcrit de *Arfl*, comme région nécessaire à la liaison par Stau1 (Kim, Furic et al. 2007).

Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² ont des rôles à la fois complémentaires et redondants et sont associées à des transcrits participants à de nombreuses fonctions cellulaires

Tel qu'abordé précédemment, afin de mieux définir le rôle de ces différents isoformes, nous avons entrepris de déterminer la fonction des transcrits liés par chacun d'eux. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme d'annotation DAVID.

Nos résultats semblent indiquer qu'en fait Stau1 et Stau2 participent aux mêmes mécanismes cellulaires dans les HEK293. En effet, les ARNm liés par celles-ci contribuent aux mêmes fonctions métaboliques, soit le métabolisme et la physiologie cellulaire, la localisation et le transport, la transcription, l'épissage alternatif, la liaison de métaux ainsi que les activités catalytiques. Cependant, il est intéressant de constater que ce sont là tous

des mécanismes nécessitant une régulation fine, afin de permettre à la cellule de modifier rapidement son activité métabolique face à un stimulus quelconque.

Diverses voies de signalisation pourraient ainsi modifier l'état post-traductionnel de Stau, ou encore d'une autre composante du mRNP, transformer ainsi la structure du complexe et, par le fait même, le destin des ARNm qui lui sont associés. Pensons aux divers exemples abordés dans l'introduction, tels ceux de la protéine ZBP1 et de la kinase Src, ou encore, de Stau et de l'activité neuronale induite par le KCl. De plus, la présence de transcrits responsables de la localisation et du transport suppose que Stau puisse réguler sa propre destinée (Furic, Maher-Laporte et al. 2008).

Stau participe à de nombreux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, de la traduction à la dégradation en passant par le transport d'ARNm (Dugre-Brisson, Elvira et al. 2005)(Kim, Furic et al. 2005) (Kohrmann, Luo et al. 1999; Tang, Meulemans et al. 2001). Ainsi, il n'est pas surprenant qu'elle s'associe à de nombreux ARNm dont les fonctions ne sont pas nécessairement reliées. D'autre part, la duplication du gène, au cours de l'évolution, pourrait expliquer l'importance de ces différents paralogues et isoformes dans la régulation d'ARNm impliqués au niveau des mêmes mécanismes cellulaires. Cette complexité additionnelle permettrait une régulation plus fine des différents transcrits lors de la mise en œuvre de ces divers phénomènes au fil de l'évolution.

Malgré qu'aucun mécanisme ne soit spécifiquement associé à un isoforme, il fut intéressant de constater que les gènes participants à chacune de ces fonctions différaient entre les divers paralogues de Stau. Il semble donc que Stau1 et Stau2 participent aux mêmes mécanismes cellulaires, mais de façon complémentaire, en régulant chacun l'expression de gènes distincts. En effet, dans chaque catégorie seulement 30% de ces gènes sont communs.

Les ARNm associés à Stau2⁶² et Stau2⁵⁹ sont également retrouvés au sein des mêmes catégories métaboliques. Cependant, cette fois environ 60% des gènes sont

communs aux deux complexes. Il semble donc que ces deux isoformes remplissent, au contraire, des fonctions redondantes. Toutefois, il est également possible que leur rôle au niveau de la régulation post-transcriptionnelle soit différent et qu'ainsi les transcrits communs qui leur sont associés soient régulés différemment.

Les populations d'ARNm liées par les différents isoformes de Staufen sont distinctes de celles présentes dans d'autres complexes de transport

Il nous a paru pertinent de vérifier si les ARNm présents dans les divers complexes ribonucléoprotéiques de Stau1 se retrouvaient également dans les mRNP de d'autres protéines liant l'ARN, afin de déterminer, sur un autre plan, la spécificité des ARNm associés à celle-ci.

Il est déjà difficile de comparer les transcrits identifiés à partir de différentes micropuces d'ADN, d'autant plus que les résultats peuvent différer légèrement d'une plateforme à l'autre pour un même type de puce. Mais nous devons de plus comparer les transcrits de différents tissus, espèces et états de différenciation cellulaire.

Néanmoins, nous avons fait la correspondance entre les 432 gènes identifiés dans les mRNP de FMRP isolés à partir de cerveaux de souris, et ceux présents sur la micropuce que nous avons utilisée (Brown, Jin et al. 2001). Nous avons pu déterminer qu'il existait 355 orthologues de ces gènes chez l'humain, représentés par 1363 oligonucléotides sur notre puce.

Nous avons établi que seuls 52 de ces transcrits étaient enrichis dans l'IP Stau1⁵⁵-HA. Donc, seulement 15% (52/355) des ARNm présents dans les mRNP de FMRP, sont également retrouvés dans l'IP Stau1. Il semble donc que ces complexes soient majoritairement distincts. Il est possible que Stau1 et FMRP soient associées aux mêmes

transcrits dans des complexes communs, car, plus d'une fois, ces deux protéines furent retrouvées en association.

La correspondance est encore moindre lorsque l'on compare les transcrits associés à Stau1 avec ceux présents dans les complexes d'IMP1 (Jonson, Vikesaa et al. 2007). En effet, seulement 7% des transcrits présents dans les complexes d'IMP1 sont également retrouvés dans les mRNP de Stau1, ou à l'inverse, 1,6% des ARNm associés à Stau1 se retrouvent également dans les complexes d'IMP1. N'oublions pas que dans ce cas, Stau1 ne colocalise pas avec IMP1.

Étude comparative des populations d'ARNm associées à Stau1

Tel que mentionné précédemment, une première étude par micropuces d'ADN avait préalablement identifié 23 ARNm comme étant des cibles potentielles de Stau1 (Kim, Furic et al. 2005). Dans notre étude, nous ne retrouvons que 9 de ces 23 transcrits dans la population d'ARNm associée à Stau1⁵⁵-HA. De plus, Arf1, la cible la mieux décrite de Stau1, n'en fait pas partie.

Nous expliquons ces résultats par le fait que nous avons fait quatre hybridations sur une puce contenant 54 000 gènes, contrairement à une quantité moindre d'hybridation sur une puce de 22 000 gènes dans l'étude précédente. En effet, Arf1 fut enrichie de 2,5 fois dans trois de nos quatre immunoprécipitations. C'est pourquoi il ne fut pas retenu, cette fois, comme ligand potentiel. De même, les 14 autres transcrits ne remplissaient pas l'un ou l'autre des critères de sélection. Cela signifie en fait que notre étude est davantage stringente. Nous avons choisi d'utiliser des critères de sélection plus stricts, malgré la possibilité d'omettre l'identification de certaines cibles potentielles d'ARNm, afin de réduire au maximum la présence de faux positifs.

Caractérisation des mRNP neuronaux de Staufen2

Dans la continuité de notre démarche, nous avons voulu caractériser les complexes ribonucléoprotéiques neuronaux de Stau1 et Stau2, afin de déterminer si, à ce niveau, ces deux protéines participaient également aux mêmes mécanismes de régulation cellulaire ou si, au contraire, elles avaient des rôles distincts. Cependant, nous n'avons pu entreprendre d'isoler les mRNP de Stau1, car nous ne possédons pas, dans le laboratoire, d'anticorps qui puissent immunoprécipiter l'isoforme murin de la protéine. Nous nous sommes donc concentrés sur les mRNP neuronaux de Stau2.

Comme décrit, Stau2 est majoritairement exprimée dans les tissus nerveux. Il sera intéressant de comparer la population d'ARNm à laquelle elle s'associe au niveau neuronal avec celle identifiée dans les HEK293. Nous avons également voulu identifier les partenaires protéiques neuronaux de Stau2, en espérant ainsi mieux définir son rôle dans le neurone.

Identification des ARNm associés aux complexes neuronaux de Stau2

Ainsi, dans un premier temps, nous avons entrepris d'identifier les ARNm associés à Stau2 grâce aux micropuces d'ADN d'Illumina contenant 22 226 oligonucléotides. Les transcrits isolés à la suite de l'immunoprécipitation de la protéine endogène, à partir d'un extrait de cerveau d'embryon de rat, furent hybridés sur ces micropuces.

Nous avons utilisé comme contrôle négatif les transcrits recueillis à l'aide d'un anticorps pré-immun (PI). De plus, afin de nous assurer de la spécificité des transcrits identifiés, nous avons effectué plusieurs IP, et ce, à l'aide de deux anticorps distincts contre Stau2, L1 et L2. En effet, nous avons hybridé quatre IP différentes effectuées avec

l'anticorps L1, deux avec le L2 et enfin six contrôles effectués de concert lors de chaque IP Stau2.

L'analyse des transcrits identifiés, à l'aide des puces d'Illumina, nous permet de transposer sur un graphique PCA la nature de la population d'ARNm identifiés. Ainsi, plus deux expériences se ressemblent, plus les points sur le graphique sont regroupés. À l'inverse, plus elles sont différentes, plus les points se retrouvent à l'opposé les uns des autres sur le graphique. Nous avons ainsi pu observer que chaque IP était très reproductible puisque les IP L1, L2 et PI étaient regroupées avec leurs analogues respectifs. Ce qui indique que les transcrits isolés à l'aide des anticorps L1 et L2 diffèrent de ceux isolés à partir de l'anticorps pré-immun. Ces résultats confirment la spécificité et la reproductibilité de nos immunoprécipitations. Cependant, cela indique également qu'il existe une légère distinction entre les transcrits isolés avec les anticorps L1 et L2. Il est possible que chaque anticorps ait une préférence pour un isoforme plutôt qu'un autre ou qu'ils reconnaissent différents épitopes de Stau2, correspondant à différentes structures de granules, ou encore qu'ils aient simplement des niveaux de non-spécificité différents. Ces distinctions pourraient expliquer la légère différence entre les populations de transcrits isolés à partir des anticorps L1 et L2.

Cette fois, nous avons utilisé un p-value de 0.002 et avons considéré comme positif les transcrits enrichis de plus de 8 fois, car nous avons utilisé différentes puces et ces paramètres nous permettent d'être plus stringents dans ce nouveau contexte. De cette façon, 1780 transcrits furent identifiés comme étant spécifiquement associés à Stau2.

Nous avons confirmé la présence de plusieurs de ces ARNm par RT-PCR, à l'aide des transcrits isolés à la suite de l'immunoprécipitation de Stau2 par les anticorps L1 et L2. Nous avons utilisé comme contrôle négatif certains ARNm enrichis moins de six fois. Comme de fait, ceux-ci ne furent pas identifiés en quantité supérieurs au contrôle au sein des divers immunoprécipitats. Ces résultats appuient le fait que nous soyons parvenus à identifier une population d'ARNm associés aux mRNP de Stau2.

Des transcrits identifiés dans cette étude, 22% sont également présents dans les complexes de Stau2-HA préalablement caractérisés (Furic, Maher-Laporte et al. 2008). Ce faible résultat peut s'expliquer de différentes façons. Par exemple, par le fait que les complexes ribonucléoprotéique neuronaux diffèrent de ceux présents dans un autre type cellulaire, que les transcrits exprimés dans ces deux types cellulaires soient distincts, ou encore que nous ayons isolé cette fois une sous-classe de mRNP. L'étude protéique suggère en effet que nous avons isolé les particules solubles. De plus, la présence de cofacteurs neuronaux spécifiques permettant la localisation dendritique d'ARNm diffère sûrement des mRNP responsables du métabolisme cellulaire dans une cellule comme les HEK293.

Afin de mieux déterminer le rôle de Stau2 au niveau neuronal, nous avons identifié la fonction des transcrits qui lui sont associés. À l'aide du programme BABELOMICS, nous avons pu déterminer que ceux-ci étaient impliqués dans la modification post-traductionnelle, le métabolisme de l'ARN, la traduction et la neurogénèse. Au niveau post-traductionnel il s'agit de kinase, de phosphatase et d'ubiquitine ligase. Ces résultats sont intéressants, considérant que lors de la modulation synaptique, LTP ou LTD, de nombreuses protéines doivent être régulées via ces mécanismes. L'absence de traduction et/ou de transport de ces transcrits peut être à l'origine de la forme immature des épines observée lorsque l'expression de Stau2 est réduite par siRNA (Goetze, Tuebing et al. 2006).

Mentionnons, que nous avons identifié comme cible potentielle l'ARNm de l'*actine-β*, un transcrit dont les niveaux sont grandement diminuée lorsque Stau2 est sous-exprimée (Goetze, Tuebing et al. 2006). Ceci appuie l'idée que Stau2 jouerait un rôle au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de ce transcrit.

Identification de facteurs protéiques associés aux complexes neuronaux de Stau2

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris d'identifier les facteurs protéiques présents au sein des complexes de Stau2. Pour ce faire, nous avons isolé les mRNP de Stau2 par immunoprécipitation. Nous avons ensuite purifié les protéines présentes dans le complexe et procédé à leur identification grâce à la spectrométrie de masse. De cette façon, nous avons pu identifier, en association avec Stau2, les protéines suivantes: Y box-binding protein 1 (YB1), polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), heat-shock cognate protein 70 (hsc70), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (hnRNPH1), α -tubulin, β -tubulin ainsi que la protéine RUFY3 (rap2-interacting protein X). L'absence de protéines ribosomiques suggère que nous avons isolé une particule de transport plutôt qu'un granule d'ARN. De plus, il fut intéressant de constater que toutes les protéines identifiées, à l'exception de RUFY3, furent déjà caractérisées dans des complexes ribonucléoprotéiques. Cela renforce l'idée que nous avons bel et bien isolé un complexe protéique.

Nous introduirons chacune de ces protéines afin de mieux comprendre l'importance potentielle de celles-ci au sein des mRNP de Stau2.

YB1 est un répresseur traductionnel faisant compétition aux protéines de la coiffe en déplaçant eIF4E et eIF4G des ARNm. Plusieurs kinases peuvent lever cette inhibition, dont Akt, Rsk1/2 kinase et PKC α (Evdokimova, Ruzanov et al. 2006) (Stratford, Fry et al. 2008). Il est intéressant de suggérer que, lors de l'activité synaptique, l'une ou l'autre des voies de signalisation active une kinase qui, à son tour, permettra d'inhiber l'activité de YB1 et ainsi permettre la traduction des transcrits nécessaires à la modulation synaptique.

Il est connu que PABPC1 joue un rôle majeur au niveau de la traduction, en permettant aux transcrits d'adopter une structure circulaire lorsqu'elle est liée à la queue poly(A), facilitant ainsi la traduction de ceux-ci (Mangus, Evans et al. 2003). Cependant,

PABPC1 est également impliquée dans l'inhibition de la traduction de certains ARNm dont ceux qui codent pour la *céruroplasmine* et *PABPC1* (Patel, Ma et al. 2005)(Mazumder, Seshadri et al. 2001). En effet, elle induit l'inhibition de la traduction de son propre transcrite lorsqu'elle est liée dans la région 5'UTR de celui-ci. De plus, PABPC1 est nécessaire à la localisation dendritique du transcrite de la *vasopressine* (Mohr, Prakash et al. 2001). Ces observations soulèvent plusieurs hypothèses intéressantes quant à l'importance de PABPC1 dans les complexes de Stau2.

Mentionnons que YB1 et PABPC1 ont la capacité de lier la tubuline, ce qui suggère qu'elles peuvent servir de point d'ancrage au mRNP sur le réseau de microtubules une fois le complexe arrivé à destination (Chernov, Mechulam et al. 2008) (Chernov, Curmi et al. 2008). De plus, cette fonction pourrait expliquer en partie la présence des protéines α - et β -tubuline au sein du complexe tout comme la liaison de Stau2 aux microtubules via son domaine TBD. Fait intéressant : l'association de YB1 à la tubuline interfère avec sa liaison à l'ARN. Ainsi, son ancrage pourrait faciliter la traduction des transcrits auxquels elle est liée.

Les chaperonnes de la famille des hsp70 sont des composantes essentielles du système de repliement protéique, mais jouent également des rôles importants au sein de plusieurs phénomènes biologiques différents. En effet, en plus d'avoir des rôles de premier plan dans l'assemblage et le bon repliement de protéines nouvellement synthétisées ou mal repliées, dans la prévention et la solubilisation d'agrégations protéiques, celles-ci sont impliquées à la fois dans la transduction de signaux moléculaires, dans le transit nucléocytoplasmique, dans la stabilité de l'ARN, dans la différenciation, le cycle cellulaire et même dans l'apoptose (Henics, Nagy et al. 1999)(Mayer and Bukau 2005) (Kose, Furuta et al. 2005). Nous discuterons plus en détail, dans la section suivante, de certaines hypothèses intéressantes pouvant suggérer l'importance de hsc70 dans les mRNP de Stau2.

hnRNPH1 est une protéine liant l'ARN et jouant un rôle déterminant dans l'épissage d'ARNm (Matunis, Xing et al. 1994). Il est possible qu'hnRNPH1 permette la formation initiale du complexe de Stau2 au niveau nucléaire.

Finalement, RUFY3 semble spécifique au mRNP de Stau2. Son rôle est peu décrit dans la littérature. Nous savons cependant que lorsque celle-ci est sous-exprimée, les neurones possèdent un surplus d'axones (Mori, Wada et al. 2007). Il est donc possible qu'elle joue son rôle de concert avec Stau2 afin de permettre le développement dendritique.

Présence de PABPC1, YB1, et hsc70 dans les mRNP de Stau2⁶² et Stau2⁵⁹

Comme les divers isoformes de Stau2 possèdent chacun leurs particularités, nous avons cherché à savoir si les protéines que nous avons identifiées s'associaient préférentiellement à l'un ou l'autre des isoformes, Stau2⁶² ou Stau2⁵⁹. En fait, nous avons confirmé la présence de PABPC1, YB1, et hsc70 à la fois dans les mRNP de Stau2⁶² et de Stau2⁵⁹ par des études de coimmunoprécipitation à partir des cellules N2A. Ainsi, pour ces trois protéines, il ne semble pas y avoir de spécificité d'association favorisant un isoforme plutôt qu'un autre.

Nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de hnRNPH1 avec les deux isoformes de Stau2 étudiés. Il est possible qu'il s'agisse d'un faux positif. Mais il est également envisageable que l'association soit transitoire, que les N2A soient déficientes en facteurs nécessaires à l'association de hnRNPH1 à Stau2, ou encore qu'hnRNPH1 soit associée avec l'un ou l'autre des deux autres isoformes de Stau2 non étudiées, soit Stau2⁵⁶ ou Stau2⁵².

Suite à la confirmation de la présence de PABPC1, YB1, et hsc70 au sein des complexes de Stau2, nous avons voulu déterminer si l'association observée était permise grâce à des ponts d'ARN. En effet, il s'agit là de trois protéines possédant des domaines de liaison à l'ARN. Nous avons donc refait ces expériences de coimmunoprécipitation, mais cette fois, avec l'ajout de RNase. Dans ces conditions, l'association des deux isoformes de Stau2 avec PABPC1 et YB1 fut abolie. Cependant, hsc70 fut toujours présente dans les complexes de Stau2⁵⁹ et de Stau2⁶². Ce n'est pas très surprenant que l'association de Stau2 avec les protéines PABPC1 et YB1 soit dépendante de l'ARN, vu les fonctions de celles-ci.

Intéraction protéine-protéine directe entre Stau2 et hsc70

Nous fûmes très enthousiastes quant à la possibilité qu'il existe une interaction directe entre Stau2 et hsc70. Ainsi, sachant que l'interaction entre Stau2 et hsc70 était permise grâce à des interactions protéine-protéine, nous avons voulu déterminer si celles-ci interagissaient directement entre elles ou si l'interaction dépendait d'une troisième protéine. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches d'étude d'association *in vitro* à l'aide des protéines purifiées, GST-hsc70 et MBP-Stau2⁶², soit la précipitation à la GST et la résonance plasmonique de surface. Il fut intéressant de constater que dans les deux cas, l'association des deux protéines était toujours présente. Cela confirme l'interaction directe entre Stau2 et hsc70.

Les protéines de la famille des hsp70, dont hsc70, possèdent un domaine N-terminal ATPasique et un domaine de liaison au substrat en C-terminal. C'est la liaison des hsp70 au domaine hydrophobe de leur substrat qui permet le bon repliement de celui-ci. Elles assistent les protéines dans leur repliement grâce à une mécanique d'association et de dissociation. Ce cycle est possible par une liaison séquentielle entre l'ATP et l'ADP dans le domaine ATPasique d'hsp70. Suite à la liaison du nucléotide dans le domaine ATPasique,

un changement conformationnel est induit et transmis de façon allostérique au domaine de liaison du substrat. Celui-ci modifie alors sa structure et relâche ainsi la protéine. Lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, hsc70 adopte une conformation de grande affinité pour son substrat, puis le cycle recommence (Mayer and Bukau 2005).

Nous avons donc cherché à savoir si l'addition d'ATP modifierait l'association entre ces deux protéines. Pour ce faire, nous avons ajouté le nucléotide lors des deux essais de liaison *in vitro*. Dans les deux situations, l'ajout d'ATP eut comme conséquence d'abolir l'interaction protéine-protéine. Ainsi, nous avons été à même de constater que l'association entre hsc70 et Stau2 était modulable. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'importance d'une telle association. En effet, hsc70 possède de nombreuses fonctions. Elle peut en effet participer au repliement de Stau2, mais également à sa restructuration lors de l'activation synaptique, à son transit nucléo-cytoplasmique ou encore servir d'intermédiaire à la kinésine (Henics, Nagy et al. 1999)(Mayer and Bukau 2005) (Kose, Furuta et al. 2005).

Citons en exemple l'importance de hsc70 lors de la dissociation de la kinésine des organites membranaires (Tsai, Morfini et al. 2000). La kinésine est responsable du transport d'organites membranaires le long des axones de neurones. Cependant, nous savons peu de choses en ce qui a trait à la nature du lien qui unit ceux-ci, mis à part sa très grande force d'association. La force de ce lien suggère qu'un mécanisme énergétique est nécessaire afin de séparer l'organite du moteur. L'ajout d'hsc70 purifiées à un homogénat cellulaire a permis de récupérer une grande partie de la kinésine. Cela suggère que hsc70 jouerait un rôle important dans la relâche de l'organite par la kinésine (Tsai, Morfini et al. 2000). Il semble que hsc70 jouerait son rôle au niveau de la chaîne légère de la kinésine. En effet, l'ajout d'un anticorps reconnaissant la chaîne légère de la kinésine permet également la libération de la kinésine de l'organite. Ce phénomène pourrait être extrapolé aux complexes protéiques de Stau2 où hsc70 permettrait la relâche du complexe de la kinésine une fois arrivé à destination.

Aussi, comme nous l'avons souligné, hsc70 joue également un rôle au niveau du transit nucléocytoplasmique (Kose, Furuta et al. 2005). En effet, hsc70 est responsable du transit nucléo-cytoplasmique de nombreuses karyophérines et, ainsi, pourrait jouer un rôle déterminant au niveau du transit nucléaire de Stau2. Cependant, aucun rôle au niveau d'exportine-5 ou de CRM1 ne fut établi.

Faible colocalisation dendritique entre Stau2 et PABPC1, YB1, hsc70 et hnRNPH1

Maintenant que nous avons confirmé la présence de PABPC1, YB1 et d'hsc70 au sein des mRNP neuronaux de Stau2, nous avons cherché à déterminer si ces associations étaient présentes au niveau dendritique.

Nous savons que PABPC1 et YB1 font partie de nombreux mRNP. Il ne fut donc pas surprenant de constater que Stau2 ne colocalisait pas entièrement avec ces deux protéines. En fait, au niveau dendritique, très peu de complexes de Stau2 colocalisent avec PABP et YB1 dans les plus grands mRNP. Il en va de même pour hsc70. Il semble donc que l'association soit préférentiellement au niveau des plus petits complexes ribonucléoprotéiques, ce qui est en accord avec le fait que nous ayons isolé une particule plutôt qu'un granule d'ARN.

Malgré l'absence de la coimmunoprécipitation de hnRNPH1 avec Stau2, nous avons tout de même procédé à l'étude de colocalisation. Sa présence uniquement nucléaire suggère que s'il existe une association entre celle-ci et Stau2, elle soit majoritairement permise dans ce compartiment cellulaire.

Importance de Stau1 et Stau2 au niveau de la physiologie neuronale

Suite à l'avancé de nouvelles données sur la caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1 et de Stau2, nous avons voulu déterminer l'importance de ceux-ci dans les phénomènes neurophysiologiques. Nous nous sommes concentrés sur leurs rôles dans la morphologie des épines dendritiques ainsi qu'au niveau de la transmission et plasticité synaptique.

Nous avons déjà discuté, dans l'introduction, du rôle capital de Stau2 au niveau de la morphologie des épines et de la transmission synaptique (Goetze, Tuebing et al. 2006). Nous avons donc privilégié l'étude du rôle de Stau1 dans ces mécanismes neuronaux, afin de déterminer si ces deux orthologues de Stau possédaient des fonctions similaires ou distinctes. De plus, en collaboration avec le Dr Lacaille le laboratoire a poursuivi la caractérisation du rôle de Stau2 dans les phénomènes neurophysiologiques. Nous discuterons plus loin des résultats très intéressants qu'ils ont obtenus, en mettant en parallèle l'importance de Stau1 et de Stau2 dans les mécanismes de la LTP et de la LTD.

Rôle de Stau1 au niveau de la potentialisation à long terme, la L-LTP

Nous avons préalablement établi l'importance de la traduction locale d'ARNm et de la transcription de nouveaux transcrits dans la mise en œuvre de la L-LTP. Stau1 pourrait jouer de nombreux rôles au niveau de ce mécanisme neurophysiologique, tant dans la traduction locale que dans le transport dendritique des nouveaux transcrits. Voilà pourquoi nous avons cherché à savoir si la L-LTP pouvait être dépendante de Stau1.

Pour ce faire, nous avons utilisé le protocole d'induction de la L-LTP dans une tranche d'hippocampe en culture, consistant en l'ajout de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase. Ce traitement fait augmenter les niveaux d'AMPC et, par le fait même, le nombre de récepteurs NMDA à la surface synaptique. Ces récepteurs sont nécessaires à la mise en place de la L-LTP en permettant la transmission de l'activité synaptique. Cette

activité permet normalement la potentialisation des fEPSP, une mesure de la LTP, pendant au moins 3,5h (Kopeck, Li et al. 2006 ; Kelleher, Govindarajan et al. 2004). Cependant, lorsque nous induisons ce même traitement dans une tranche d'hippocampe transfectée avec un siRNA contre Stau1, cette potentialisation est abolie et demeure au niveau du contrôle. Ce résultat très éloquent démontre l'importance de Stau1 dans la mise en œuvre de la L-LTP.

Nous avons déterminé que la sous-expression de Stau1 n'avait pas de répercussion sur la localisation dendritique générale d'ARNm. Cela suggère qu'elle est nécessaire à la localisation d'une sous-catégorie d'ARNm. En effet, nous savons du moins qu'elle est importante dans le transport du transcrite de la *CaMKII α* (Kanai, Dohmae et al. 2004).

Cependant, nous avons utilisé le Syto 14 comme marqueur d'ARN. De ce fait, nous pouvons ainsi visualiser tous les ARN présents au sein de la cellule, tels l'ARNr, l'ARNt, l'ARNnc et l'ARNm. Cela peut expliquer que nous n'avons pas été en mesure d'observer une diminution du transport global d'ARN au niveau dendritique, contrairement à l'équipe de Vessey qui, en hybridant avec une sonde ciblant spécifiquement la queue-poly-A, a observé une diminution de la localisation dendritique d'ARNm dans les neurones mutantes pour Stau1 (Vessey, Macchi et al. 2008).

La région 3'UTR de l'ARNm de *CaMKII α* est responsable de la localisation dendritique du transcrite. Les souris mutantes, n'arborant plus cette portion régulatrice, démontrent des difficultés d'apprentissage. De plus, lorsque mis en culture, ces neurones possèdent une L-LTP réduite (Miller, Yasuda et al. 2002). Cela indique que ce n'est pas l'absence du transcrite qui importe, mais bien sa bonne localisation. Cependant, il y a un bémol, car les niveaux protéiques furent également réduits. Il existe donc une possibilité que les résultats observés soient dus à une faible concentration protéique plutôt qu'à une localisation erronée du transcrite. Néanmoins, l'importance de Stau1 dans la localisation de ce transcrite fut déjà établie. Il est donc possible que la L-LTP soit abolie dans les neurones

sous-exprimant Stau1 par l'abolition concomitante du transport et/ou de la traduction de ce transcrit.

Nous fûmes intéressés de constater que la transmission de base entre l'élément pré et post synaptique n'était pas affecté par le siRNA contre Stau1, comme le démontrent les graphiques électrophysiologiques de la relation « input-output » et du ratio de la stimulation appariée. Cela signifie que les éléments synaptiques sont toujours fonctionnels et ne sont donc pas simplement détruits. L'inhibition de la L-LTP par la sous-expression de Stau1 n'est donc pas simplement due à la perte d'éléments fonctionnels, mais réside plutôt dans l'incapacité de ceux-ci à induire les changements synaptiques nécessaires.

Dans le même ordre d'idées, la E-LTP, induite par deux protocoles expérimentaux, soit le theta burst stimulation (TBS) ou la stimulation à haute fréquence (HFS), ne fut pas affectée par la sous-expression de Stau1. De même, Stau1 n'est pas impliquée dans l'induction de la LTD. Mentionnons que l'activation des récepteurs mGluR1/5 par le DHPG induit la LTD des synapses excitatrices et lors du développement précoce, comme c'est notre cas, cette LTD est indépendante de nouvelles synthèses protéiques. Tout comme la E-LTP d'ailleurs. Ensemble, ces résultats confèrent à Stau1 un rôle spécifique au niveau de l'induction de la L-LTP et renforce l'idée que les synapses conservent la capacité d'être modulées par d'autres mécanismes neurologiques.

Maintenant que nous avons démontré l'importance de Stau1 dans la L-LTP, nous avons cherché à savoir à quel niveau pré et/ou post synaptique elle agissait. Pour ce faire, nous avons entrepris d'étudier la transmission au niveau synaptique, par la technique de voltage-imposé, afin de déterminer si la sous-expression de Stau1 induisait un changement fonctionnel au niveau de la synapse excitatrice. Nous avons mesuré les mEPSC d'une cellule pyramidale transfectée avec le siRNA contre Stau1 afin d'en déterminer l'impact sur l'amplitude et la fréquence de l'activité synaptique.

L'amplitude représente la fonctionnalité de l'élément post-synaptique, le nombre de récepteurs à la surface de même que leur sensibilité. La fréquence représente, à l'inverse, l'activité pré-synaptique, sa fréquence de décharge de neurotransmetteur ou encore le nombre de synapses fonctionnelles. Nos résultats démontrent que la sous-expression de *Stau1* réduit à la fois l'amplitude et la fréquence des mEPSC. Cela tend à illustrer le rôle de *Stau1* à la fois au niveau pré et post synaptique, contrairement au résultat observé pour *Stau2* où seule l'amplitude du courant était affectée, conférant ainsi à *Stau2* un rôle uniquement au niveau post-synaptique.

À la suite de ces résultats, il est contre intuitif d'observer que les souris mutantes pour *Stau1* n'ont aucun déficit d'apprentissage – se référer à la discussion à la section 5.5.1.2. (Vessey, Macchi et al. 2008). En effet, nous venons de démontrer l'importance de celle-ci dans la mise en œuvre de la LTP. Cette observation pourrait s'expliquer par une compensation de la fonction de *Stau1* par la protéine *Stau2*. Remarquons que l'importance de *Stau1* au niveau synaptique est possiblement reflétée par les troubles qu'éprouvent ces souris au niveau locomoteur.

Rôle de *Stau1* au niveau de la morphologie des épines

Tel que rapporté dans l'Introduction, la forme des épines de même que leur densité au niveau de la dendrite reflètent leur fonction. Les synapses longues et minces possèdent une densité post-synaptique, PSD, plus étroite et représentent majoritairement des synapses silencieuses. Au contraire, les épines plus courtes pourvues d'une grosse tête, et par le fait même d'une grande PSD, représentent des épines matures (Hotulainen and Hoogenraad 2010)(Harris and Stevens 1989; Hering and Sheng 2001). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à connaître la forme adoptée par les épines dendritiques, suite à la sous-expression de *Stau1*.

Comme le suggéraient les résultats précédents, il ne fut pas surprenant d'observer que la proportion d'épines allongées et filopodales se trouva significativement augmentée. Conséquemment, le nombre d'épines de forme normale se trouva diminué. Cependant, l'arborisation dendritique ainsi que la densité synaptique demeurèrent intactes. Nous avons pu confirmer le rôle de Stau1 dans la morphologie des épines via l'expression neuronale d'un mutant de Stau1 insensible au shRNA, qui contrecarra les effets préalablement observés.

L'augmentation du nombre d'épines de forme allongée et filopodale dans les neurones sous-exprimant Stau1 peut expliquer la diminution de la fonction synaptique telle qu'observée par la réduction de la fréquence et de l'amplitude des mEPSC. De plus, comme la densité synaptique demeure inchangée, cela suggère que Stau1 joue un rôle au niveau de l'entretien de l'épine mature et non de son développement.

Ces résultats diffèrent de ceux observés pour Stau2. En effet, la sous-expression de Stau2 augmente également le nombre d'épines filopodales. Cependant, elle diminue la densité d'épines synaptiques au niveau dendritique (Goetze, Tuebing et al. 2006). Ainsi, contrairement à Stau1, Stau2 serait impliquée dans la formation de nouvelles épines.

Les résultats obtenus par l'équipe de Vessey, avec des souris mutantes pour Stau1, diffèrent cependant légèrement des nôtres (Vessey, Macchi et al. 2008). En effet, ils observèrent une diminution dans le nombre total d'épines synaptiques, ce que nous n'avons pas observé. Il existe cependant une distinction importante à faire au niveau de l'expérimentation. En effet, nous avons fait nos observations sur des neurones dans la structure bien définie qu'est l'hippocampe. Ces neurones sont organisés de façon bien précise. À la suite de la transfection du siRNA contre Stau1, ces neurones n'ont pas à refaire leur connexion. Alors que l'équipe de Vessey a plutôt utilisé des neurones en cultures, ce qui signifie que les neurones doivent d'abord être isolés, séparés de leur architecture, puis doivent refaire de nouvelles connexions lorsque remis en culture. Ainsi,

cette divergence peut expliquer le fait qu'ils ont pu mettre en lumière une réduction du nombre total de synapses alors que ce ne fut pas notre cas. Remarquons que cela peut également expliquer le fait que l'équipe de Goetze observa une diminution du nombre d'épines avec le siRNA contre Stau2 (Goetze, Tuebing et al. 2006). Cependant, en accord avec nos résultats, l'expression du mutant de Stau1 augmente également le nombre d'épines de forme immature.

Stau1 est nécessaire à la L-LTP alors que Stau2 est responsable de la LTD

Depuis la publication de nos résultats, d'autres résultats, obtenus conjointement avec le laboratoire du Dr Lacaille, démontrant encore davantage la dichotomie existante entre ces deux orthologues furent publiés (Lebeau, Miller et al. 2011). Nous avons démontré l'importance de Stau1 dans la L-LTP ainsi que sa non participation dans la LTD. Ils ont démontré qu'à l'inverse, Stau2 était impliquée dans la mise en place de la LTD et ne jouait aucun rôle déterminant au niveau de la L-LTP (Lebeau, Miller et al. 2011). Ces résultats confirment que ces deux protéines possèdent des rôles distincts dans la modulation synaptique.

De plus, ils ont démontré l'importance spécifique de Stau2 dans le transport dendritique de l'ARNm de *Map1b*, un transcrite nécessaire à la LTD. En effet, le transport de celui-ci n'est pas affecté par la sous-expression de Stau1. À l'inverse, l'importance de Stau1 dans le transport du transcrite de *CamKII α* , un transcrite nécessaire à la L-LTP, fut à nouveau confirmé, et cette fois, c'est Stau2 qui ne joue aucun rôle dans le transport du transcrite. Ainsi, les différentes fonctions synaptiques observées semblent pouvoir être expliquées en partie par l'association de Stau1 et Stau2 à des populations distinctes d'ARNm.

Nous avons mentionné précédemment que les transcrits associés à Stau1 et Stau2 faisaient partie des mêmes mécanismes et donc, que ces deux protéines possédaient des rôles complémentaires au sein des mêmes phénomènes cellulaires. Cependant, ces études ont été faites dans les cellules HEK293T. Il est possible que la complexité neuronale induise la participation de Stau1 et Stau2 dans des mécanismes de régulation totalement différents. Aussi, l'annotation de « gene ontology » reste assez vague. Ainsi, il est possible que ces deux protéines participent à des mécanismes cellulaires communs, cependant de façon opposée ou encore au niveau de différentes sous-catégories.

Il est également possible qu'un même transcrit participe à des fonctions opposées. Prenons l'exemple du transcrit de *Arc* qui, localisé constitutivement est nécessaire à la LTD, alors que son transport actif est primordial lors de la L-LTP induite par l'activité synaptique (Park, Park et al. 2008)(Steward, Wallace et al. 1998)(Bramham, Alme et al. 2010). Ainsi, il est possible que, malgré qu'il puisse exister une population de transcrits communément associés à Stau1 et Stau2 au niveau neuronal, celle-ci soient régulés différemment afin de permettre différents mécanismes neuronaux.

PERSPECTIVE

Ces résultats présentent de nombreuses perspectives d'avenir dans l'étude plus pointue des complexes ribonucléoprotéiques de Stau1 et Stau2. En effet, il est possible de pousser d'avantage l'étude des transcrits identifiés, de l'association entre Stau2 et hsc70 ou encore des mécanismes régulant la LTP et la LTD dépendante de Stau1 et Stau2, respectivement.

Déterminer la région du transcrit associée à Stau au niveau du 3'UTR, de la séquence codante, ou encore du 5'UTR permettra de mieux cibler le rôle de celle-ci dans cette association. En effet, cette information est primordiale pour la fonction qu'exercera Stau1 au niveau du transcrit. Sa liaison dans la région 5'UTR dirigera le transcrit vers les polysomes pour la traduction, alors que sa liaison dans la région 3'UTR favorisera plutôt sa dégradation et/ou son transport.

Pouvoir identifier une structure double-brin commune aux transcrits et liée spécifiquement par Stau1 ou Stau2 reste l'un des buts les plus intéressants à atteindre. L'analyse bioinformatique et les expériences de mutagenèse permettront peut-être un jour d'y arriver.

Il serait également pertinent de faire l'étude plus poussée du transport de certains des ARNm identifiés, que ce soit par hybridation *in situ* ou encore en cellules vivantes, à l'aide de divers transcrits rapporteurs. Qu'en est-il de la localisation de ces transcrits lors de la sous-expression de Stau ? Quelle région de l'ARNm est nécessaire à cette localisation ? Le transport de Stau et de ces transcrits est-il induit par l'activité synaptique ? Si oui, via quelle voie de signalisation ? Quels récepteurs y sont impliqués ? Et quel est le rôle de Stau1 et de Stau2 au niveau de la traduction locale de ces transcrits ? Voilà autant de questions que de possibilités de recherche. De plus, Stau1 possède de nombreuses fonctions, il faudra déterminer lesquelles sont responsables de la mise en œuvre de la L-LTP, et ce, au niveau de quels ARNm.

Il serait également de mise d'étudier l'importance des protéines identifiées par spectrométrie de masse, principalement hsc70, dans le transport dendritique de Stau2. Quel est l'effet de la sous-expression de ces protéines sur la localisation de Stau2 ? Quel est l'effet de cette sous-expression sur la localisation des transcrits associés à Stau2, de même que sur la morphologie synaptique et la plasticité synaptique dépendante de Stau2 ? L'étude plus poussée des domaines responsables de l'association de Stau2 et hsc70 serait également à faire, afin de mieux caractériser cette alliance.

L'étude en spectrométrie de masse des particules neuronales de Stau1 serait également très intéressante à aborder. De quelles façons les protéines présentes dans celles-ci se distinguent-elles de celles identifiées dans les particules de Stau2 ? De même, qu'en est-il des transcrits neuronaux d'ARNm associés Stau1 comparativement à ceux que nous avons identifiés en association avec Stau2 ?

CONCLUSION

Dans l'ensemble, nos résultats sont très intéressants, car ils démontrent l'importance de Stau1 et Stau2 au sein de différents complexes ribonucléoprotéiques. En effet, nous avons réussi à déterminer que ces protéines étaient majoritairement associées à des populations spécifiques d'ARNm et qu'elles possédaient des rôles distincts au niveau neurophysiologique, tant dans la transmission synaptique que dans la morphologie neuronale.

Nous avons également réussi à mettre en lumière certaines composantes des mRNP neuronaux de Stau2, dont un partenaire protéique direct, hsc70, partenaire dont l'association est modulable par l'action de l'ATP.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Shahrour, F., P. Minguéz, et al. (2005). "BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W460-464.
- Allison, R., K. Czaplinski, et al. (2004). "Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis." Rna **10**(11): 1751-1763.
- Alvarez, V. A., D. A. Ridenour, et al. (2006). "Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference." J Neurosci **26**(30): 7820-7825.
- Anderson, K. D., M. A. Morin, et al. (2000). "Overexpression of HuD, but not of its truncated form HuD I+II, promotes GAP-43 gene expression and neurite outgrowth in PC12 cells in the absence of nerve growth factor." J Neurochem **75**(3): 1103-1114.
- Anderson, K. D., J. Sengupta, et al. (2001). "Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells in vitro." Exp Neurol **168**(2): 250-258.
- Angenstein, F., A. M. Evans, et al. (2005). "Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex." J Biol Chem **280**(8): 6496-6503.
- Antar, L. N., R. Afroz, et al. (2004). "Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses." J Neurosci **24**(11): 2648-2655.
- Ashraf, S. I., A. L. McLoon, et al. (2006). "Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*." Cell **124**(1): 191-205.
- Atkins, C. M., N. Nozaki, et al. (2004). "Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-dependent protein synthesis is regulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(22): 5193-5201.
- Auweter, S. D. and F. H. Allain (2008). "Structure-function relationships of the polypyrimidine tract binding protein." Cell Mol Life Sci **65**(4): 516-527.

- Bagni, C. and W. T. Greenough (2005). "From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome." Nat Rev Neurosci **6**(5): 376-387.
- Balagopal, V. and R. Parker (2009). "Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs." Current opinion in cell biology **21**(3): 403-408.
- Bamburg, J. R. (1999). "Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 185-230.
- Banker, G. and K. Goslin (1988). "Developments in neuronal cell culture." Nature **336**(6195): 185-186.
- Bannai, H., K. Fukatsu, et al. (2004). "An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites." J Biol Chem **279**(51): 53427-53434.
- Barbee, S. A., P. S. Estes, et al. (2006). "Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies." Neuron **52**(6): 997-1009.
- Bashirullah, A., R. L. Cooperstock, et al. (1998). "RNA localization in development." Annu Rev Biochem **67**: 335-394.
- Bassell, G. and R. H. Singer (1997). "mRNA and cytoskeletal filaments." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 109-115.
- Bassell, G. J., Y. Oleynikov, et al. (1999). "The travels of mRNAs through all cells large and small." FASEB Journal **13**(3): 447-454.
- Bassell, G. J., Y. Oleynikov, et al. (1999). "The travels of mRNAs through all cells large and small." Faseb J **13**(3): 447-454.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.
- Blazejczyk, M., Miron, M., Nadon, R. . (2007). "FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays.", from <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>
- Bolognani, F., M. A. Merhege, et al. (2004). "Dendritic localization of the RNA-binding protein HuD in hippocampal neurons: association with polysomes and upregulation during contextual learning." Neurosci Lett **371**(2-3): 152-157.
- Bourdeau, M. L., F. Morin, et al. (2007). "Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons." J Neurosci **27**(8): 1942-1953.

- Bradshaw, K. D., N. J. Emptage, et al. (2003). "A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP." Eur J Neurosci **18**(11): 3150-3152.
- Bramham, C. R. and D. G. Wells (2007). "Dendritic mRNA: transport, translation and function." Nat Rev Neurosci **8**(10): 776-789.
- Bramham, C. R., M. N. Alme, et al. (2010). "The Arc of synaptic memory." Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale **200**(2): 125-140.
- Brendel, C., M. Rehbein, et al. (2004). "Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes." Biochem J **384**(Pt 2): 239-246.
- Bregues, M., D. Teixeira, et al. (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." Science **310**(5747): 486-489.
- Brennan, C. M. and J. A. Steitz (2001). "HuR and mRNA stability." Cell Mol Life Sci **58**(2): 266-277.
- Brizard, F., M. Luo, et al. (2000). "Genomic organization of the human and mouse stau genes." DNA Cell Biol **19**(6): 331-339.
- Broadus, J., S. Fuerstenberg, et al. (1998). "Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate." Nature **391**(6669): 792-795.
- Brown, V., P. Jin, et al. (2001). "Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome." Cell **107**(4): 477-487.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Mol Cell **36**(6): 932-941.
- Buchner, G., M. T. Bassi, et al. (1999). "Identification of a novel homolog of the Drosophila stau protein in the chromosome 8q13-q21.1 region." Genomics **62**(1): 113-118.
- Bullock, S. L. (2007). "Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex?" Semin Cell Dev Biol **18**(2): 194-201.
- Cai, Y., X. Yu, et al. (2009). "A brief review on the mechanisms of miRNA regulation." Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute **7**(4): 147-154.

- Cao, Q. and J. D. Richter (2002). "Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation." The EMBO journal **21**(14): 3852-3862.
- Carmody, S. R. and S. R. Wenthe (2009). "mRNA nuclear export at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 12): 1933-1937.
- Chaerkady, R., C. L. Kerr, et al. (2009). "Temporal analysis of neural differentiation using quantitative proteomics." Journal of proteome research **8**(3): 1315-1326.
- Chavez-Noriega, L. E. and C. F. Stevens (1992). "Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin." Brain Res **574**(1-2): 85-92.
- Chekulaeva, M., M. W. Hentze, et al. (2006). "Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles." Cell **124**(3): 521-533.
- Chernov, K. G., P. A. Curmi, et al. (2008). "Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP." FEBS letters **582**(19): 2875-2881.
- Chernov, K. G., A. Mechulam, et al. (2008). "YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules." BMC biochemistry **9**: 23.
- Chen, C. Y., R. Gherzi, et al. (2001). "AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs." Cell **107**(4): 451-464.
- Chernov, K. G., P. A. Curmi, et al. (2008). "Atomic force microscopy reveals binding of mRNA to microtubules mediated by two major mRNP proteins YB-1 and PABP." FEBS Lett **582**(19): 2875-2881.
- Chernov, K. G., A. Mechulam, et al. (2008). "YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules." BMC Biochem **9**: 23.
- Chotiner, J. K., H. Khorasani, et al. (2003). "Adenylyl cyclase-dependent form of chemical long-term potentiation triggers translational regulation at the elongation step." Neuroscience **116**(3): 743-752.

- Ciechanover, A., A. Orian, et al. (2000). "Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction." Bioessays **22**(5): 442-451.
- Comery, T. A., J. B. Harris, et al. (1997). "Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5401-5404.
- Cougot, N., S. Babajko, et al. (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells." J Cell Biol **165**(1): 31-40.
- Czech, B. and G. J. Hannon (2011). "Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes." Nature reviews. Genetics **12**(1): 19-31.
- De Boulle, K., A. J. Verkerk, et al. (1993). "A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation." Nat Genet **3**(1): 31-35.
- Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, et al. (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." Genome Biol **4**(5): P3.
- DesGroseillers, L. and N. Lemieux (1996). "Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization." Genomics **36**(3): 527-529.
- Doyle, M. and M. F. Jantsch (2002). "New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain." J Struct Biol **140**(1-3): 147-153.
- Dubnau, J., A. S. Chiang, et al. (2003). "The staufer/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory." Curr Biol **13**(4): 286-296.
- Duchaine, T., H. J. Wang, et al. (2000). "A novel murine Staufer isoform modulates the RNA content of Staufer complexes." Mol Cell Biol **20**(15): 5592-5601.
- Duchaine, T. F., I. Hemraj, et al. (2002). "Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles." J Cell Sci **115**(Pt 16): 3285-3295.
- Dugre-Brisson, S., G. Elvira, et al. (2005). "Interaction of Staufer1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs." Nucleic Acids Res **33**(15): 4797-4812.
- Elvira, G., B. Massie, et al. (2006). "The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufer 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons." J Neurochem **96**(1): 105-117.
- Elvira, G., S. Wasiak, et al. (2006). "Characterization of an RNA granule from developing brain." Mol Cell Proteomics **5**(4): 635-651.

- Evdokimova, V., L. P. Ovchinnikov, et al. (2006). "Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation." Cell Cycle **5**(11): 1143-1147.
- Evdokimova, V., P. Ruzanov, et al. (2006). "Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species." Mol Cell Biol **26**(1): 277-292.
- Evdokimova, V., P. Ruzanov, et al. (2001). "The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer." Embo J **20**(19): 5491-5502.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, et al. (2010) "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." Annu Rev Biochem **79**: 351-379.
- Falley, K., J. Schutt, et al. (2009). "Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region." Traffic **10**(7): 844-857.
- Ferrandon, D., L. Elphick, et al. (1994). "Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner." Cell **79**(7): 1221-1232.
- Ferrandon, D., I. Koch, et al. (1997). "RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles." Embo J **16**(7): 1751-1758.
- Ferrari, F., V. Mercaldo, et al. (2007). "The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines." Mol Cell Neurosci **34**(3): 343-354.
- Fitzjohn, S. M., A. E. Kingston, et al. (1999). "DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists." Neuropharmacology **38**(10): 1577-1583.
- Fonseca, R., R. M. Vabulas, et al. (2006). "A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP." Neuron **52**(2): 239-245.
- Frey, U., M. Krug, et al. (1988). "Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro." Brain Res **452**(1-2): 57-65.
- Frydman, J. (2001). "Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones." Annu Rev Biochem **70**: 603-647.

- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, et al. (2003). "Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo." Neuron **38**(3): 447-460.
- Furic, L., M. Maher-Laporte, et al. (2008). "A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes." RNA **14**(2): 324-335.
- Galarneau, A. and S. Richard (2005). "Target RNA motif and target mRNAs of the Quaking STAR protein." Nat Struct Mol Biol **12**(8): 691-698.
- Gama-Carvalho, M., N. L. Barbosa-Morais, et al. (2006). "Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic-shuttling mammalian splicing factors." Genome Biol **7**(11): R113.
- Gatignol, A., C. Buckler, et al. (1993). "Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsI kinase and Drosophila staufen." Mol Cell Biol **13**(4): 2193-2202.
- Gelinas, J. N. and P. V. Nguyen (2005). "Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation." J Neurosci **25**(13): 3294-3303.
- Giorgi, C., G. W. Yeo, et al. (2007). "The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression." Cell **130**(1): 179-191.
- Goetze, B., F. Tuebing, et al. (2006). "The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis." J Cell Biol **172**(2): 221-231.
- Gong, C., Y. K. Kim, et al. (2009). "SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs." Genes Dev **23**(1): 54-66.
- Grange, J., A. Belly, et al. (2009). "Specific interaction between Sam68 and neuronal mRNAs: implication for the activity-dependent biosynthesis of elongation factor eEF1A." J Neurosci Res **87**(1): 12-25.
- Greene, L. E., R. Zinner, et al. (1995). "Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein." J Biol Chem **270**(7): 2967-2973.

- Greenough, W. T., A. Y. Klintsova, et al. (2001). "Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7101-7106.
- Gunkel, N., T. Yano, et al. (1998). "Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA." Genes Dev **12**(11): 1652-1664.
- Hachet, O. and A. Ephrussi (2004). "Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization." Nature **428**(6986): 959-963.
- Hachet, O. and A. Ephrussi (2001). "Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport." Curr Biol **11**(21): 1666-1674.
- Hallegger, M., A. Taschner, et al. (2006). "RNA aptamers binding the double-stranded RNA-binding domain." Rna.
- Hallegger, M., A. Taschner, et al. (2006). "RNA aptamers binding the double-stranded RNA-binding domain." Rna **12**(11): 1993-2004.
- Harris, K. M. and J. K. Stevens (1989). "Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." J Neurosci **9**(8): 2982-2997.
- Hegde, A. N., K. Inokuchi, et al. (1997). "Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediately-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia." Cell **89**(1): 115-126.
- Henics, T., E. Nagy, et al. (1999). "Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability." J Biol Chem **274**(24): 17318-17324.
- Herbert, A. and A. Rich (2001). "The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the in vivo editing of minimal substrates by ADAR1." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12132-12137.
- Hering, H. and M. Sheng (2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." Nat Rev Neurosci **2**(12): 880-888.
- Hieronymus, H. and P. A. Silver (2004). "A systems view of mRNP biology." Genes Dev **18**(23): 2845-2860.
- Hillebrand, J., S. A. Barbee, et al. (2007). "P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity." ScientificWorldJournal **7**: 178-190.
- Hirokawa, N. (2006). "mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks." J Neurosci **26**(27): 7139-7142.

- Hirokawa, N. and R. Takemura (2005). "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons." Nat Rev Neurosci **6**(3): 201-214.
- Hoek, K. S., G. J. Kidd, et al. (1998). "hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA." Biochemistry **37**(19): 7021-7029.
- Hotulainen, P. and C. C. Hoogenraad "Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function." J Cell Biol **189**(4): 619-629.
- Hou, L., M. D. Antion, et al. (2006). "Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression." Neuron **51**(4): 441-454.
- Huang, Y. S., J. H. Carson, et al. (2003). "Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB." Genes Dev **17**(5): 638-653.
- Huang, Y. S., M. Y. Jung, et al. (2002). "N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA
- Huang, Y. Y., X. C. Li, et al. (1994). "cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase." Cell **79**(1): 69-79.
- Huber, K. M., M. S. Kayser, et al. (2000). "Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression." Science **288**(5469): 1254-1257.
- Huber, K. M., N. B. Sawtell, et al. (1998). "Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex." J Neurosci **18**(1): 1-9.
- Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nature reviews. Genetics **12**(2): 99-110.
- Hurst, S. R., R. F. Hough, et al. (1995). "Deamination of mammalian glutamate receptor RNA by Xenopus dsRNA adenosine deaminase: similarities to in vivo RNA editing." Rna **1**(10): 1051-1060.
- Huttelmaier, S., D. Zenklusen, et al. (2005). "Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1." Nature **438**(7067): 512-515.
- Huynh, J. R., T. P. Munro, et al. (2004). "The Drosophila hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in osk mRNA localization." Dev Cell **6**(5): 625-635.

- Irion, U. and D. St Johnston (2007). "bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex." Nature **445**(7127): 554-558.
- Irwin, S. A., B. Patel, et al. (2001). "Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination." Am J Med Genet **98**(2): 161-167.
- Jambhekar, A. and J. L. Derisi (2007). "Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport." Rna **13**(5): 625-642.
- Jeong, J. H., Y. J. Nam, et al. (2007). "The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway." J Neurochem **102**(6): 2073-2084.
- Jiang, J., K. Prasad, et al. (2005). "Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone." Mol Cell **20**(4): 513-524.
- Jin, P., R. S. Alisch, et al. (2004). "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation." Nat Cell Biol **6**(11): 1048-1053.
- Johnson, E. M., Y. Kinoshita, et al. (2006). "Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites." J Neurosci Res **83**(6): 929-943.
- Jonson, L., J. Vikesaa, et al. (2007). "Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules." Mol Cell Proteomics **6**(5): 798-811.
- Jonson, L., J. Vikesaa, et al. (2007). "Molecular composition of IMP1 RNP granules." Mol Cell Proteomics.
- Judge, A. D., V. Sood, et al. (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." Nat Biotechnol **23**(4): 457-462.
- Kanai, Y., N. Dohmae, et al. (2004). "Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule." Neuron **43**(4): 513-525.
- Kanhema, T., G. Dagestad, et al. (2006). "Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP in vivo: evidence for compartment-specific translation control." Journal of neurochemistry **99**(5): 1328-1337.
- Karcher, R. L., S. W. Deacon, et al. (2002). "Motor-cargo interactions: the key to transport specificity." Trends in cell biology **12**(1): 21-27.

- Karpova, A., M. Mikhaylova, et al. (2006). "Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses." J Neurosci **26**(18): 4949-4955.
- Keene, J. D. (2007). "RNA regulons: coordination of post-transcriptional events." Nat Rev Genet **8**(7): 533-543.
- Keene, J. D. and P. J. Lager (2005). "Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression." Chromosome Res **13**(3): 327-337.
- Keene, J. D. and S. A. Tenenbaum (2002). "Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons." Mol Cell **9**(6): 1161-1167.
- Kelleher, R. J., 3rd, A. Govindarajan, et al. (2004). "Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory." Cell **116**(3): 467-479.
- Khatua, S., K. M. Peterson, et al. (2003). "Overexpression of the EGFR/FKBP12/HIF-2alpha pathway identified in childhood astrocytomas by angiogenesis gene profiling." Cancer Res **63**(8): 1865-1870.
- Kiebler, M. A. and G. J. Bassell (2006). "Neuronal RNA granules: movers and makers." Neuron **51**(6): 685-690.
- Kiebler, M. A. and L. DesGroseillers (2000). "Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system." Neuron **25**(1): 19-28.
- Kiebler, M. A., I. Hemraj, et al. (1999). "The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport." J Neurosci **19**(1): 288-297.
- Kim-Ha, J., K. Kerr, et al. (1995). "Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential." Cell **81**(3): 403-412.
- Kim, K. C. and H. K. Kim (2006). "Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation." Neurosci Lett **397**(1-2): 48-52.
- Kim, Y. K., L. Furic, et al. (2005). "Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay." Cell **120**(2): 195-208.
- Kim, Y. K., L. Furic, et al. (2007). "Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts." Embo J **26**(11): 2670-2681.
- Kohrmann, M., M. Luo, et al. (1999). "Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons." Mol Biol Cell **10**(9): 2945-2953.

- Kopec, C. D., B. Li, et al. (2006). "Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation." J Neurosci **26**(7): 2000-2009.
- Kose, S., M. Furuta, et al. (2005). "The 70-kD heat shock cognate protein (hsc70) facilitates the nuclear export of the import receptors." J Cell Biol **171**(1): 19-25.
- Krichevsky, A. M. and K. S. Kosik (2001). "Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation." Neuron **32**(4): 683-696.
- Lebeau, G., M. Maher-Laporte, et al. (2008). "Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells." Mol Cell Biol **28**(9): 2896-2907.
- Lebeau, G., L. C. Miller, et al. (2011). "Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons." Learning & memory **18**(5): 314-326.
- Lecuyer, E., H. Yoshida, et al. (2007). "Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function." Cell **131**(1): 174-187.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." The EMBO journal **23**(20): 4051-4060.
- Lehmann, K. A. and B. L. Bass (2000). "Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities." Biochemistry **39**(42): 12875-12884.
- Ling, D. S., L. S. Benardo, et al. (2006). "Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors." Hippocampus **16**(5): 443-452.
- Liu, J., J. Y. Hu, et al. (2006). "Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in Aplysia sensory neurons." J Neurosci **26**(19): 5204-5214.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, et al. (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." Nat Cell Biol **7**(7): 719-723.

- Liu, Z. R., A. M. Wilkie, et al. (1996). "Detection of double-stranded RNA-protein interactions by methylene blue-mediated photo-crosslinking." RNA **2**(6): 611-621.
- Lopez de Heredia, M. and R. P. Jansen (2004). "mRNA localization and the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 80-85.
- Luo, M., T. F. Duchaine, et al. (2002). "Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association." Biochem J **365**(Pt 3): 817-824.
- Macchi, P., A. M. Brownawell, et al. (2004). "The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export." J Biol Chem **279**(30): 31440-31444.
- Macchi, P., S. Kroening, et al. (2003). "Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner." J Neurosci **23**(13): 5778-5788.
- Maher-Laporte, M. and L. DesGroseillers "Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains." BMB Rep **43**(5): 344-348.
- Mallardo, M., A. Deitinghoff, et al. (2003). "Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2100-2105.
- Manabe, T., P. Renner, et al. (1992). "Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents." Nature **355**(6355): 50-55.
- Mangus, D. A., M. C. Evans, et al. (2003). "Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression." Genome Biol **4**(7): 223.
- Maquat, L. E. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 89-99.
- Marion, R. M., P. Fortes, et al. (1999). "A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum." Mol Cell Biol **19**(3): 2212-2219.
- Martel, C., S. Dugre-Brisson, et al. "Multimerization of Staufen1 in live cells." Rna **16**(3): 585-597.
- Martel, C., P. Macchi, et al. (2006). "Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants." Biochem J **393**(Pt 1): 245-254.

- Martin, K. C. and A. Ephrussi (2009). "mRNA localization: gene expression in the spatial dimension." Cell **136**(4): 719-730.
- Matunis, M. J., J. Xing, et al. (1994). "The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization." Nucleic acids research **22**(6): 1059-1067.
- Matsui, H., H. Asou, et al. (2007). "Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70." Mol Cell **25**(1): 99-112.
- Matsuzaki, F., T. Ohshiro, et al. (1998). "miranda localizes staufer and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis." Development **125**(20): 4089-4098.
- Matsuzaki, M., G. C. Ellis-Davies, et al. (2001). "Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Nat Neurosci **4**(11): 1086-1092.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." Cell Mol Life Sci **62**(6): 670-684.
- Mazumder, B., V. Seshadri, et al. (2001). "Translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A)-binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G." Mol Cell Biol **21**(19): 6440-6449.
- McCoy, P. A. and L. L. McMahon (2007). "Muscarinic receptor dependent long-term depression in rat visual cortex is PKC independent but requires ERK1/2 activation and protein synthesis." Journal of neurophysiology **98**(4): 1862-1870.
- McKinney, R. A. (2005). "Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1299-1302.
- Meignin, C. and I. Davis "Transmitting the message: intracellular mRNA localization." Curr Opin Cell Biol **22**(1): 112-119.
- Mendez, R. and J. D. Richter (2001). "Translational control by CPEB: a means to the end." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 521-529.
- Micklem, D. R., J. Adams, et al. (2000). "Distinct roles of two conserved Staufer domains in oskar mRNA localization and translation." Embo J **19**(6): 1366-1377.

- Miki, T. and Y. Yoneda (2004). "Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1)." J Biol Chem **279**(46): 47473-47479.
- Miller, S., M. Yasuda, et al. (2002). "Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation." Neuron **36**(3): 507-519.
- Misteli, T., J. F. Caceres, et al. (1997). "The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells." Nature **387**(6632): 523-527.
- Miyashiro, K. Y., A. Beckel-Mitchener, et al. (2003). "RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice." Neuron **37**(3): 417-431.
- Mobarak, C. D., K. D. Anderson, et al. (2000). "The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells." Mol Biol Cell **11**(9): 3191-3203.
- Mohr, E., N. Prakash, et al. (2001). "Vasopressin mRNA localization in nerve cells: characterization of cis-acting elements and trans-acting factors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7072-7079.
- Monshausen, M., N. H. Gehring, et al. (2004). "The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons." Neuromolecular Med **6**(2-3): 127-144.
- Monshausen, M., U. Putz, et al. (2001). "Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA." J Neurochem **76**(1): 155-165.
- Monshausen, M., M. Rehbein, et al. (2002). "The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1." J Neurochem **81**(3): 557-564.
- Moore, M. J. (2005). "From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs." Science **309**(5740): 1514-1518.
- Mori, T., T. Wada, et al. (2007). "Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity." J Biol Chem **282**(27): 19884-19893.
- 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): 828-843.
- Moser, J. J. and M. J. Fritzler (2010). "Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies." The international journal of biochemistry & cell biology **42**(6): 828-843.

- Munro, T. P., R. J. Magee, et al. (1999). "Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking." The Journal of biological chemistry **274**(48): 34389-34395.
- Narayanan, U., V. Nalavadi, et al. (2007). "FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(52): 14349-14357.
- Nekrasov, M. P., M. P. Ivshina, et al. (2003). "The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage." J Biol Chem **278**(16): 13936-13943.
- Nguyen, P. V., T. Abel, et al. (1994). "Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP." Science **265**(5175): 1104-1107.
- Nimchinsky, E. A., A. M. Oberlander, et al. (2001). "Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice." J Neurosci **21**(14): 5139-5146.
- Nusser, Z., R. Lujan, et al. (1998). "Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus." Neuron **21**(3): 545-559.
- Ohashi, S., K. Koike, et al. (2002). "Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor." J Biol Chem **277**(40): 37804-37810.
- Oleynikov, Y. and R. H. Singer (2003). "Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization." Current biology : CB **13**(3): 199-207.
- Ostroff, L. E., J. C. Fiala, et al. (2002). "Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices." Neuron **35**(3): 535-545.
- Otmakhov, N., L. Khibnik, et al. (2004). "Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent." J Neurophysiol **91**(5): 1955-1962.

- Park, S., J. M. Park, et al. (2008). "Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD." Neuron **59**(1): 70-83.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." Mol Cell **25**(5): 635-646.
- Patel, G. P., S. Ma, et al. (2005). "The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex." Nucleic Acids Res **33**(22): 7074-7089.
- Perrone-Bizzozero, N. and F. Bolognani (2002). "Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity." J Neurosci Res **68**(2): 121-126.
- Perry, R. B. and M. Fainzilber (2009). "Nuclear transport factors in neuronal function." Semin Cell Dev Biol **20**(5): 600-606.
- Pierce, J. P., K. van Leyen, et al. (2000). "Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines." Nat Neurosci **3**(4): 311-313.
- Pinkstaff, J. K., S. A. Chappell, et al. (2001). "Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2770-2775.
- Ramasamy, S., H. Wang, et al. (2006). "Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells." Dev Biol **292**(2): 393-406.
- Ramos, A., P. Bayer, et al. (1999). "Determination of the structure of the RNA complex of a double-stranded RNA-binding domain from Drosophila Staufen protein." Biopolymers **52**(4): 181-196.
- Ramos, A., S. Grunert, et al. (2000). "RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain." Embo J **19**(5): 997-1009.
- Riechmann, V. and A. Ephrussi (2001). "Axis formation during Drosophila oogenesis." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 374-383.
- Roegiers, F. and Y. N. Jan (2000). "Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons?" Trends Cell Biol **10**(6): 220-224.
- Rook, M. S., M. Lu, et al. (2000). "CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage." J Neurosci **20**(17): 6385-6393.

- Ross, A. F., Y. Oleynikov, et al. (1997). "Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein." Mol Cell Biol **17**(4): 2158-2165.
- Ryan, C. M., J. C. Harries, et al. (2006). "Functional interaction of CREB binding protein (CBP) with nuclear transport proteins and modulation by HDAC inhibitors." Cell cycle **5**(18): 2146-2152.
- Ryter, J. M. and S. C. Schultz (1998). "Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA." Embo J **17**(24): 7505-7513.
- Ryu, N. K., M. H. Yang, et al. (2007). "Gene expression profiling of rewarding effect in methamphetamine treated Bax-deficient mouse." J Biochem Mol Biol **40**(4): 475-485.
- Sabatini, B. L., M. Maravall, et al. (2001). "Ca(2+) signaling in dendritic spines." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 349-356.
- Sanchez-Carbente, M. and L. DesGroseillers (2008). "Understanding the importance of mRNA transport in memory." Prog Brain Res **169**: 41-58.
- Sasaki, Y., K. Welshhans, et al. "Phosphorylation of zipcode binding protein 1 is required for brain-derived neurotrophic factor signaling of local beta-actin synthesis and growth cone turning." J Neurosci **30**(28): 9349-9358.
- Scanziani, M., M. Capogna, et al. (1992). "Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus." Neuron **9**(5): 919-927.
- Scheetz, A. J., A. C. Nairn, et al. (2000). "NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses." Nat Neurosci **3**(3): 211-216.
- Schmid, D., A. Baici, et al. (1994). "Kinetics of molecular chaperone action." Science **263**(5149): 971-973.
- Schratt, G. M., F. Tuebing, et al. (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." Nature **439**(7074): 283-289.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Sheth, U. and R. Parker (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." Science **300**(5620): 805-808.

- Shi, S. H., Y. Hayashi, et al. (1999). "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." Science **284**(5421): 1811-1816.
- Shi, Y. and J. O. Thomas (1992). "The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate." Mol Cell Biol **12**(5): 2186-2192.
- Shiina, N., K. Shinkura, et al. (2005). "A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation." J Neurosci **25**(17): 4420-4434.
- Silva, A. L. and L. Romao (2009). "The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision?" FEBS Lett **583**(3): 499-505.
- Simons, M. and J. Trotter (2007). "Wrapping it up: the cell biology of myelination." Current opinion in neurobiology **17**(5): 533-540.
- Skabkin, M. A., O. I. Kiselyova, et al. (2004). "Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1." Nucleic Acids Res **32**(18): 5621-5635.
- Sledz, C. A., M. Holko, et al. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-839.
- Sorokin, A. V., E. R. Kim, et al. (2007). "Nucleocytoplasmic transport of proteins." Biochemistry (Mosc) **72**(13): 1439-1457.
- Sossin, W. S. and L. DesGroseillers (2006). "Intracellular trafficking of RNA in neurons." Traffic **7**(12): 1581-1589.
- St Johnston, D. (1995). "The intracellular localization of messenger RNAs." Cell **81**(2): 161-170.
- St Johnston, D., N. H. Brown, et al. (1992). "A conserved double-stranded RNA-binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10979-10983.
- Steward, O. and E. M. Schuman (2001). "Protein synthesis at synaptic sites on dendrites." Annu Rev Neurosci **24**: 299-325.
- Steward, O. and P. F. Worley (2001). "Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation." Neuron **30**(1): 227-240.

- Steward, O., C. S. Wallace, et al. (1998). "Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites." Neuron **21**(4): 741-751.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, et al. (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." J Neurosci Methods **37**(2): 173-182.
- Stratford, A. L., C. J. Fry, et al. (2008). "Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells." Breast Cancer Res **10**(6): R99.
- Sutherland, B. W., J. Kucab, et al. (2005). "Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells." Oncogene **24**(26): 4281-4292.
- Sutton, M. A. and E. M. Schuman (2006). "Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory." Cell **127**(1): 49-58.
- Tang, S. J., D. Meulemans, et al. (2001). "A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites." Neuron **32**(3): 463-475.
- Tang, S. J. and E. M. Schuman (2002). "Protein synthesis in the dendrite." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1420): 521-529.
- Teixeira, D., U. Sheth, et al. (2005). "Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs." RNA **11**(4): 371-382.
- Tenenbaum, S. A., C. C. Carson, et al. (2000). "Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14085-14090.
- Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, et al. (2005). "Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes." Mol Biol Cell **16**(1): 405-420.
- Thomas, M. G., L. J. Tosar, et al. (2009). "Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly." J Cell Sci **122**(Pt 4): 563-573.
- Tiedge, H. and J. Brosius (1996). "Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture." J Neurosci **16**(22): 7171-7181.

- Tiruchinapalli, D. M., Y. Oleynikov, et al. (2003). "Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons." J Neurosci **23**(8): 3251-3261.
- Torgerson, T. R., A. D. Colosia, et al. (1998). "Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50." Journal of immunology **161**(11): 6084-6092.
- Townley-Tilson, W. H., S. A. Pendergrass, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein." Rna **12**(10): 1853-1867.
- Tsai, M. Y., G. Morfini, et al. (2000). "Release of kinesin from vesicles by hsc70 and regulation of fast axonal transport." Mol Biol Cell **11**(6): 2161-2173.
- Turrigiano, G. G. (2000). "AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity." Neuron **26**(1): 5-8.
- Vagner, S., B. Galy, et al. (2001). "Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites." EMBO Rep **2**(10): 893-898.
- van Eeden, F. J., I. M. Palacios, et al. (2001). "Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole." J Cell Biol **154**(3): 511-523.
- Vessey, J. P., P. Macchi, et al. (2008). "A loss of function allele for murine Stauf1 leads to impairment of dendritic Stauf1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16374-16379.
- Villace, P., R. M. Marion, et al. (2004). "The composition of Stauf1-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs." Nucleic Acids Res **32**(8): 2411-2420.
- Vo, N., M. E. Klein, et al. (2005). "A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16426-16431.
- Volk, L. J., C. A. Daly, et al. (2006). "Differential roles for group 1 mGluR subtypes in induction and expression of chemically induced hippocampal long-term depression." J Neurophysiol **95**(4): 2427-2438.

- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova, et al. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." Angew Chem Int Ed Engl **44**(45): 7342-7372.
- Welte, M. A. (2004). "Bidirectional transport along microtubules." Current biology : CB **14**(13): R525-537.
- Wesche, S., M. Arnold, et al. (2003). "The UCS domain protein She4p binds to myosin motor domains and is essential for class I and class V myosin function." Current biology : CB **13**(9): 715-724.
- White, R., C. Gonsior, et al. (2008). "Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules." The Journal of cell biology **181**(4): 579-586.
- Wibrand, K., D. Panja, et al. "Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo." Eur J Neurosci **31**(4): 636-645.
- Wickham, L., T. Duchaine, et al. (1999). "Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum." Mol Cell Biol **19**(3): 2220-2230.
- Wodicka, L., H. Dong, et al. (1997). "Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Biotechnol **15**(13): 1359-1367.
- Wong, S. T., J. Athos, et al. (1999). "Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP." Neuron **23**(4): 787-798.
- Yang, M. H., K. H. Yoo, et al. (2007). "The gene expression profiling in murine cortical cells undergoing programmed cell death (PCD) induced by serum deprivation." J Biochem Mol Biol **40**(2): 277-285.
- Yang, N., O. Higuchi, et al. (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." Nature **393**(6687): 809-812.

- Yang, X. J. (2005). "Multisite protein modification and intramolecular signaling." Oncogene **24**(10): 1653-1662.
- Yano, M., H. J. Okano, et al. (2005). "Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation." J Biol Chem **280**(13): 12690-12699.
- Yoon, Y. J. and K. L. Mowry (2004). "Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin." Development **131**(13): 3035-3045.
- Yuste, R. and W. Denk (1995). "Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration." Nature **375**(6533): 682-684.
- Zaessinger, S., I. Busseau, et al. (2006). "Oskar allows nanos mRNA translation in Drosophila embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4." Development **133**(22): 4573-4583.
- Zalfa, F., T. Achsel, et al. (2006). "mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis." Curr Opin Neurobiol **16**(3): 265-269.
- Zeitelhofer, M., D. Karra, et al. (2008). "Dynamic interaction between P-bodies and transport ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons." J Neurosci **28**(30): 7555-7562.
- Zhang, H. L., T. Eom, et al. (2001). "Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility." Neuron **31**(2): 261-275.

ANNEXE I : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article1)

ARTICLE 1: A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes



Timothy W. Nilsen, Editor
Center for RNA Molecular Biology
Case Western Reserve University School
of Medicine
10900 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44106-4973
USA
tel.: 216-368-1606
fax: 216-368-2010

August 5, 2010

Marjolaine Maher Laporte
Université de Montréal
PO Box 6128 Centre Ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7

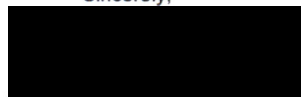
Dear Marjolaine Maher Laporte,

As the editor of *RNA* and a representative of the RNA Society I give you permission to reproduce the following

A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes.
Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L.
RNA. 2008 Feb;14(2):324-35.

The article will be reproduced in a Ph.D. dissertation at Université de Montréal.

Sincerely,



Timothy W. Nilsen
Editor, RNA

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.uqam.ca.

1. Identification


Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0: Ph.D. Biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs Maher-Laporte Marjolaine, Furi Luc, DesGroseillers Luc	
Titre A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes	
État actuel de l'article	<input checked="" type="checkbox"/> publié <input type="checkbox"/> soumis pour publication <input type="checkbox"/> en préparation
Revue / journal * RNA, 2008 Feb;14(2):324-35.	
* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.	

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Marjolaine Maher-Laporte
à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise sa thèse de doctorat
qui a pour titre Caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2

Furi Luc		
Coauteur	Signature	Date
DesGroseillers Luc		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.

1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0 :Ph.D. biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs Furic Luc, Maher-Laporte Marjolaine, DesGroseillers Luc	
Titre A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes	
État actuel de l'article <input checked="" type="checkbox"/> publié <input type="checkbox"/> soumis pour publication <input type="checkbox"/> en préparation	
Revue / journal * RNA. 2008 Feb;14(2):324-35	
* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.	

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Marjolaine Maher Laporte		
à inclure cet article dans <input type="checkbox"/> son mémoire de maîtrise <input checked="" type="checkbox"/> sa thèse de doctorat		
qui a pour titre <i>caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2</i>		
Furic Luc		
Coauteur	Signature	Date
DesGroseillers Luc		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

ANNEXE II : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article2)

ARTICLE 2: Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

Rightslink Printable License

Page 1 sur 4

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 06, 2010

This is a License Agreement between Marjolaine Maher-Laporte ("You") and American Society for Microbiology ("American Society for Microbiology") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Society for Microbiology, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2463130946887
License date	Jul 06, 2010
Licensed content publisher	American Society for Microbiology
Licensed content publication	Molecular and Cellular Biology
Licensed content title	Staufen1 Regulation of Protein Synthesis-Dependent Long-Term Potentiation and Synaptic Function in Hippocampal Pyramidal Cells
Licensed content author	Genevieve Lebeau, Jean-Claude Lacaille
Licensed content date	May 1, 2008
Volume	28
Issue	9
Start page	2896
End page	2907
Type of Use	Dissertation/Thesis
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2
Expected completion date	Aug 2010
Estimated size(pages)	150
Total	0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

[Publisher Terms and Conditions](#)

The publisher for this copyrighted material is the American Society for Microbiology (ASM). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

1. ASM hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-

time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process; any form of republication must be completed within 1 year from the date hereof (although copies prepared before then may be distributed thereafter). The copyright of all material specified remains with ASM, and permission for reproduction is limited to the formats and products indicated in your license. The text may not be altered in any way without the express permission of the copyright owners.

2. The licenses may be exercised anywhere in the world.

3. You must include the copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material, i.e. Journal name, year, volume, page numbers, DOI and reproduced/amended with permission from American Society for Microbiology.

4. The following conditions apply to photocopies:

- a. The copies must be of high quality and match the standard of the original article.
- b. The copies must be a true reproduction word for word.
- c. No proprietary/trade names may be substituted.
- d. No additional text, tables or figures may be added to the original text.
- e. The integrity of the article should be preserved, i.e., no advertisements will be printed on the article.
- f. The above permission does NOT include rights for any online or other electronic reproduction.

5. The following conditions apply to translations:

- a. The translation must be of high quality and match the standard of the original article.
- b. The translation must be a true reproduction word for word.
- c. All drug names must be generic; no proprietary/trade names may be substituted.
- d. No additional text, tables or figures may be added to the translated text.
- e. The integrity of the article should be preserved, i.e., no advertisements will be printed on the article.
- f. The translated version of ASM material must also carry a disclaimer in English and in the language of the translation. The two versions (English and other language) of the disclaimer MUST appear on the inside front cover or at the beginning of the translated material as follows:

The American Society for Microbiology takes no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and is not liable for any errors which may occur. No responsibility is assumed, and responsibility is hereby disclaimed, by the American Society for Microbiology for any injury and/or damage to persons or property as a matter of product liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of methods, products, instructions or ideas presented in the Journal. Independent verification of diagnosis and drug dosages should be made. Discussions, views, and recommendations as to medical procedures, choice of drugs and drug dosages are the responsibility of the authors.

g. This license does NOT apply to translations made of manuscripts published ahead of print as "[ASM Journal] Accepts" papers. Translation permission is granted only for the final published version of the ASM article. Furthermore, articles translated in their entirety must honor the ASM embargo period, and thus may not appear in print or online until 6 months after the official publication date in the original ASM journal.

6. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by ASM or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. In addition, permission granted is contingent upon author permission, which you MUST obtain, and appropriate credit (see item number 3 for details). If you fail to comply with any material provision of this license, ASM shall be entitled to revoke this license immediately and retain fees paid for the grant of the license. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute

copyright infringement and ASM reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

7. ASM reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. ASM makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

9. You hereby indemnify and agree to hold harmless ASM and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

10. This license is personal to you, but may be assigned or transferred by you to a business associate (or to your employer) if you give prompt written notice of the assignment or transfer to the publisher. No such assignment or transfer shall relieve you of the obligation to pay the designated license fee on a timely basis (although payment by the identified assignee can fulfill your obligation).

11. This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of ASM, by CCC on ASM 's behalf).

12. Objection to Contrary terms: ASM hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and ASM (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

13. The following terms and conditions apply to Commercial Photocopy and Commercial Reprint requests and should be considered by requestors to be additional terms. All other ASM terms and conditions indicating how the content may and may not be used also apply.

Limitations of Use:

The Materials you have requested permission to reuse in a commercial reprint or commercial photocopy are only for the use that you have indicated in your request, and they MAY NOT be used for either resale to others or republication to the public. Further, you may not decompile, reverse engineer, disassemble, rent, lease, loan, sell, sublicense, or create derivative works from the Materials without ASM's prior written permission.

14. Revocation: This license transaction shall be governed by and construed in accordance with the laws of Washington, DC. You hereby agree to submit to the jurisdiction of the federal and state courts located in Washington, DC for purposes of resolving any disputes that may arise in connection with this licensing transaction. ASM or Copyright Clearance Center may, within 30 days of issuance of this License, deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will ASM or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to ASM and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

v1.5

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

--

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
 INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat dans la section Publications du site www.umontreal.ca.

1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MA:HM2:2628108
Grade Ph.D.	Programme 3-485-1-0 (Ph.D. biochimie)	

2. Description de l'article

Auteurs
 Lebeau Geneviève, Maher-Laporte Marjolaine, Topolnik Lisa, Laurent Charles E, Sossin Wayne, Desroselliers Luc, Lacaille Jean-Claude

Titre Straufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

État actuel de l'article publié soumis pour publication en préparation

Revue / Journal *
 Mol Cell Biol. 2008 May;28(9):2898-907

* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Marjolaine Maher-Laporte
 à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise sa thèse de doctorat
 qui a pour titre caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Straufen1 et Straufen2

Lebeau Geneviève Coauteur	
Topolnik Lisa Coauteur	
Laurent Charles E Coauteur	
Sossin Wayne Coauteur	
Desroselliers Luc Coauteur	

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.


1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0 :Ph.D. biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs Lebeau Geneviève, Maher-Laporte Marjolaine, Topolnik Lisa, Laurent Charles E, Sossin Wayne, Desgroseillers Luc, Lacaille Jean-Claude			
Titre Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells			
État actuel de l'article <input checked="" type="checkbox"/> publié <input type="checkbox"/> soumis pour publication <input type="checkbox"/> en préparation			
Revue / journal * Mol Cell Biol. 2008 May;28(9):2896-907			
* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.			

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Mariolaine Maher Laporte		
à inclure cet article dans <input type="checkbox"/> son mémoire de maîtrise <input checked="" type="checkbox"/> sa thèse de doctorat		
qui a pour titre <i>caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2</i>		
Desgroseillers Luc Coauteur		
Lacaille Jean-Claude Coauteur		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

ANNEXE III : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article3)

ARTICLE 3: Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains



Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology
BMB reports
Room 812 The Korea Science and Technology Center
635-4 Yeoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-703, Korea.
Tel: 82-2-508-7434~6, Fax: 82-2-508-7578
E-mail: [REDACTED]
Homepage: <http://submit.bmbreports.org>

Dear. Dr. Marjolaine Maher-Laporte,

As an editor-in-chief of BMB reports, I give you permission to reproduce the following article,
Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains
Marjolaine Maher-Laporte & Luc DesGroseillers*
BMB Rep. 2010 May;43(5):344-8

The article including figures and contents will be reproduced in a Ph.D. dissertation at Université de Montréal. However, you should rephrase contents of the article, not directly copy and paste from the article.

Sincerely,
Hee-Sup Shin
Editor-in-chief

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.

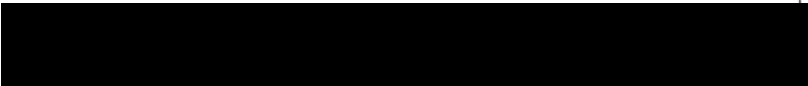
1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0 :Ph.D. biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs Maher-Laporte M, DesGroseillers L			
Titre Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains			
État actuel de l'article <input checked="" type="checkbox"/> publié <input type="checkbox"/> soumis pour publication <input type="checkbox"/> en préparation			
Revue / journal * BMB Rep. 2010 May;43(5):344-8.			
* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.			

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Mariolaine Maher Laporte		
à inclure cet article dans <input type="checkbox"/> son mémoire de maîtrise <input checked="" type="checkbox"/> sa thèse de doctorat		
qui a pour titre <i>caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2</i>		
DesGroseillers Luc		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

ANNEXE IV : Accord des Coauteurs et de l'éditeur (Article4)

ARTICLE 4 : Molecular composition of Staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain

Open-Access License

No Permission Required

The Public Library of Science (PLoS) applies the Creative Commons Attribution License (CCAL) to all works we publish (read the human-readable summary or the full license legal code). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in PLoS journals, so long as the original authors and source are cited. **No permission is required from the authors or the publishers.**



In most cases, appropriate attribution can be provided by simply citing the original article (e.g., Kaltenbach LS et al. (2007) Huntingtin Interacting Proteins Are Genetic Modifiers of Neurodegeneration. *PLoS Genet* 3(5): e82. doi:10.1371/journal.pgen.0030082). If the item you plan to reuse is not part of a published article (e.g., a featured issue image), then please indicate the originator of the work, and the volume, issue, and date of the journal in which the item appeared. For any reuse or redistribution of a work, you must also make clear the license terms under which the work was published.

This broad license was developed to facilitate open access to, and free use of, original works of all types. Applying this standard license to your own work will ensure your right to make your work freely and openly available. Learn more about open access. For queries about the license, please contact us.

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.

1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0 :Ph.D. biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs Maher-Laporte Marjolaine, Berthiaume Frédéric, Moreau Mireille, Julien Louis-André, Lapointe Gabriel, Mourez Michael, DesGroseillers Luc			
Titre Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain			
État actuel de l'article	<input checked="" type="checkbox"/> publié	<input type="checkbox"/> soumis pour publication	<input type="checkbox"/> en préparation
Revue / journal * PLoS One. 2010 Jun 28;5(6):e11350			
* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.			

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : <u>Mariolaine Maher Laporte</u>	
à inclure cet article dans <input type="checkbox"/> son mémoire de maîtrise <input checked="" type="checkbox"/> sa thèse de doctorat	
qui a pour titre <u>caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2</u>	
Berthiaume Frédéric Coauteur	
Moreau Mireille Coauteur	
Julien Louis-André Coauteur	
Lapointe Gabriel Coauteur	

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.

1. Identification

Nom Maher-Laporte	Prénom Marjolaine	Code permanent MAHM22628108
Grade Ph.D.	Programme 3-465-1-0 :Ph.D. biochimie	

2. Description de l'article

Auteurs
Maher-Laporte Marjolaine, Berthiaume Frédéric, Moreau Mireille, Julien Louis-André, Lapointe Gabriel, Mourez Michael, DesGroseillers Luc

Titre Molecular composition of staufen2-containing ribonucleoproteins in embryonic rat brain

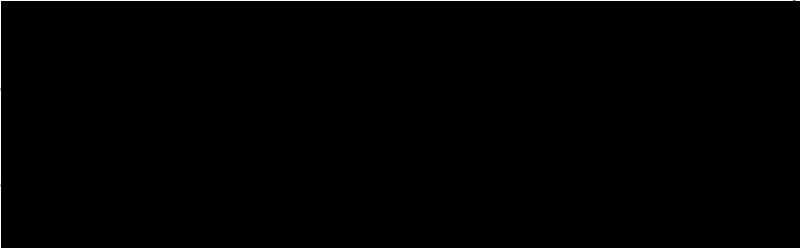
État actuel de l'article publié soumis pour publication en préparation

Revue / journal *
PLoS One. 2010 Jun 28;5(6):e11350

* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : Mariolaine Maher Laporte
à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise sa thèse de doctorat
qui a pour titre caractérisation des complexes ribonucléoprotéiques de Staufen1 et Staufen2

Mourez Michael Coauteur		
DesGroseillers Luc Coauteur		
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date