

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS XI

Champ disciplinaire : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

École Doctorale de rattachement : « Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé » (0418)

Présentée et soutenue publiquement

par

Selim BOUDOUKHA

Le 25 novembre 2011

Titre

**Étude de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des
gènes par la protéine de liaison à l'ARN IMP-2 au cours de la
myogenèse**

Directeur de Thèse : Dr. POLESSKAYA Anna

JURY

Président : Pr ROUSSET Jean-Pierre
Rapporteur : Dr LEIBOVITCH Serge
Rapporteur : Dr MORELLO Dominique
Examineur : Dr BESSE Florence
Examineur : Dr DANDOLO Luisa

À Yamina et Ahmed,

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 14 |
| INTRODUCTION | 18 |
| CHAPITRE I | 19 |
| LE MUSCLE SQUELETTIQUE | 19 |
| I. INTRODUCTION : MODELE D'ETUDE, LE MUSCLE STRIE | 19 |
| LES TYPES CELLULAIRES QUI CONSTITUENT LE MUSCLE STRIE | 19 |
| A. LES CELLULES EXTRAFUSALES OU CELLULES MUSCULAIRES STRIEES | 19 |
| B. LES CELLULES SATELLITES | 23 |
| A. FORMATION DU MUSCLE AU COURS DE L'EMBRYOGENESE | 23 |
| B. REGULATION GENIQUE DU DEVELOPPEMENT DES MUSCLES | 23 |
| C. LES FACTEURS REGULATEURS DE LA MYOGENESE (MRF) | 24 |
| D. LES PROTEINES MEF2, CO-FACTEURS DES MRFS | 25 |
| E. LA DIFFERENCIATION TERMINALE SE DISSOCIE EN DEUX ETAPES DISCRETES | 26 |
| LA SORTIE DU CYCLE PROLIFERATIF | 26 |
| L'ACTIVATION DES GENES SPECIFIQUES DU MUSCLE | 26 |
| LE SOUS-TYPE ALVEOLAIRE ARMS | 31 |
| LE SOUS-TYPE EMBRYONNAIRE ERMS | 31 |
| C. THERAPIES | 32 |
| D. CONCLUSIONS | 33 |
| CHAPITRE II | 34 |
| REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GENES | 34 |
| I. INTRODUCTION | 34 |
| B. STRUCTURES DES RBPS | 35 |
| MOTIF DE RECONNAISSANCE DE L'ARN (RRM) | 38 |
| LES DOMAINES D'HOMOLOGIE KH | 40 |

| | |
|--|-----------|
| LES DOMAINES EN DOIGTS DE ZINC (ZFD) | 42 |
| LES DOMAINES PAZ | 44 |
| CONCLUSION | 46 |
| C. FONCTIONS DES RBPS | 46 |
| L'ÉPISSAGE ALTERNATIF | 47 |
| MODIFICATION DE L'ARN | 47 |
| POLYADENYLATION DE L'ARNM DANS LE NOYAU | 48 |
| LOCALISATION DE L'ARN | 50 |
| TRADUCTION DE L'ARN | 51 |
| STABILISATION DE L'ARN | 51 |
| III. ELEMENTS CIS-REGULATEURS PRESENTS EN 3' UTR | 52 |
| A. LES ARES MEDIATEURS DE LA STABILITE DES ARNM | 53 |
| B. LES RBPS ET LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE LA MYOGENESE | 54 |
| C. LES MIRNAS | 59 |
| LES MIRNAS CARACTERISTIQUES DE LA MYOGENESE | 60 |
| DE NOUVEAUX MIRNAS REGULENT LA MYOGENESE | 62 |
| CHAPITRE III | 39 |
| LA FAMILLE DES IMPS | 39 |
| I. INTRODUCTION : | 39 |
| II. EXPRESSION SPATIO-TEMPORELLE DES ARNM ET DES PROTEINES IMPS | 44 |
| LES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE ASSOCIEES AUX IMPS | 60 |
| | 63 |
| CONTEXTE | 66 |
| I. LA REGION 3'UTR DE <i>PINCH-2</i> EST CIBLEE PAR LES MIRNAS DE LA FAMILLE LET-7 | 75 |
| III. <i>LET-7</i> ET <i>IMP-2</i> : UNE MEME VOIE DE REGULATION DE <i>PINCH-2</i> OU CO-REGULENT-ILS <i>PINCH-2</i> ? | 86 |
| DISCUSSION | 92 |
| I. VALIDATION DE LA STRATEGIE D'APPROCHE. | 93 |

| | |
|---|------------|
| II. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE ET PROTEOMIQUE DES COMPLEXES IMP-2 | 94 |
| III. LES ARNM MURF-3 ET PINCH-2 SONT REGULES PAR IMP-2 | 100 |
| III. POSSIBLE COOPERATION ENTRE IMP-2 ET LET-7 POUR LA REGULATION DE PINCH-2 ? | 101 |
| REFERENCES | 107 |
| BIBLIOGRAPHIQUES | 107 |

Remerciements

Tout d'abord je désire remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse qui ont accepté de juger mon travail de thèse. Je tiens à remercier les Drs Florence Besse et Luisa Dandolo d'avoir été examinateurs de ma thèse ainsi que les Drs Dominique Morello et Serge Leibovitch d'avoir été rapporteurs et enfin le Pr Jean-Pierre Rousset de me faire l'honneur de présider ce jury.

Un merci tout particulier au Pr Jonathan Weitzman qui m'avait vivement conseillé il y a cinq ans de cela de prendre contact avec le laboratoire du Dr Annick Harel-Bellan afin de valider mon Master 2.

Un grand merci donc à Annick qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions dont puisse souhaiter *un thésard*. Encore merci pour ce congrès à Kyoto qui me laissera un souvenir inoubliable et qui m'a fait découvrir et d'apprécier le *shabu shabu*. Promis dès que je trouve un *post-doc*, je te tiens au courant☺.

Anna, par où commencer... Ces quelques lignes ne seront suffisantes à refléter la gratitude que j'ai envers toi. Tu as été une encadrante *exceptionnelle* et j'ai eu beaucoup de chance d'évoluer à tes côtés (et on me l'a souvent répété !!!) Tu as été ce que beaucoup d'étudiants en thèse souhaitent, une personne qui a su à la fois m'enseigner un savoir scientifique et technique mais qui m'a aussi transmis sa *passion* pour la recherche. Avec moi tu as fait preuve de patience mais aussi de confiance pour mener à bien mon projet de thèse. Merci encore de m'avoir fait découvrir et partager tes lectures ... *Haruki Murakami* , j'en suis devenu fan. Ton petit côté *maternel* va certes me manquer. Je sais que les compliments te gênent donc je m'arrête ici ☺ Du fond du cœur, je te dis *спасиби*.

Un grand merci à *Tonton* qui est devenu à présent « Papa ». Pendant cette *aventure*, tu as été un *excellent* collègue qui m'a largement fait profiter de son savoir faire mais aussi un ami dont la patience (et il en faut !!!) a été rudement mis à l'épreuve avec l'écoute quotidienne et en boucle de *Rihanna* et autres *Beyoncé*. Ta contribution et ton aide ont été pour beaucoup dans la *réussite* de ma thèse.

Un clin d'œil à tous ceux et celles qui ont contribué à faire régner la bonne humeur et la camaraderie au sein de l'unité :

Mouloud, merci pour m'avoir fait tant rire et *choqué* avec tes blagues, ton franc-parler, merci pour ces longues discussions et tes conseils qui m'ont aidé au cours de ma thèse et merci d'avoir été mon *taxi* quand je rate les navettes du C.E.A. J'espère que le monde de la Recherche saura te reconnaître à ta juste valeur. Comme disait, *pupuce* tu es trop con !!! Petite pensée pour toi mon amie Nogaye qui est à des milliers de km comme « Chromataiiiiine », un merci pour toi Pascalounette, *Professeur* est devenu un *Jedi* dans la maîtrise de l'art du retard sur gel grâce à tes conseils, merci de nous avoir fait tant rire avec Néri. Néri tes insultes en italien et tes néologismes (non je ne sais pas ce que c'est un *drapouze*) nous ont valu bien des fous rires, quand tu veux pour retourner en Afrique ☺ Un ÉNORME Merci à toi Cindy, pour ton dynamisme, ta gentillesse, tu es toujours là pour nous donner un coup de main , pousser tes coups de gueule et nous faire rire et merci d'avoir pris aussi la peine et le temps (surtout) de regarder mon manuscrit. Bon courage à toi Thaiz, tu verras l'écriture de la thèse ce n'est pas aussi rébarbatif que ça en a l'air (bon, je me rends compte que je ne suis pas *crédible*). À toi *Papillon de Lumière*, ton sourire et ta bonne humeur ont égayé mes journées au laboratoire, l'hiver revient et le temps de papillonner vers d'autres contrées est venu.

Merci à tous les membres actuels et anciens qui ont fait partie de l'unité à Villejuif et à Saclay et qui m'ont passé un agréable moment au laboratoire : Guillaume et Natalia nos voisins du *dessus* avec qui il a toujours été agréable de boire un café, Ophélie, voilà mon tour est venu de boucler ce chapitre merci pour ses balades en rollers dans Paris et ces matinées (*trop tôt*) à la piscine, on a bien fait de remplacer tous ça par des séances de cinéma ☺ Merci à Cathy, Jack, Cristèle, Virginie, Aurélie, Jérémie, Viviane, Maya, Régina, Irina, Linda, Nadia, Gueorgui, Slimane, Leslie-Ann, Davy, Barbara, Massimo, Émilie, Nora, Julie et bien d'autres encore... Désolé si j'ai oublié de vous mentionner.

Merci au soutien et la présence de mes amis de l'époque *magistère* : Teddy, Nouchie et Fabien pour nos festins presque *parfaits*, les rendez-vous dominicaux au hammam de la Mosquée de Paris et les soirées *ciné* ; Jen, Élodie, Alex « *american girl* » pour nos combats de *lapins crétiens* et autres rencontres dans les bars parisiens les plus insolites. Un grand merci

à Titou, Juju, Pascale, Maylis pour leur amitié indéfectible et toujours là à confronter nos

histoires farfelues...

Merci à ma bande d'amis *capoeiristes* et à leur esprit *Capoeira Luanda* qui m'ont permis durant ces années de me défouler et de passer des moments mémorables et non *Rasta*, je ne suis pas un serial killer de souris.

Enfin un grand merci à mes sœurs Samia, Sofia et Sonia ainsi qu'à mes parents Yamina et Ahmed pour m'avoir toujours soutenu et encouragé tout au long de cette belle aventure, me voilà docteur.

Résumé

Les rhabdomyosarcomes embryonnaires et aléolaires (RMS) appartiennent aux tumeurs des tissus mous les plus fréquentes chez les enfants dont elles représentent 2/3 des cas. Plusieurs données suggèrent que la dérégulation des cellules progénitrices du muscle squelettique pourrait jouer un rôle dans l'émergence des cellules de RMS qui ont aussi bien perdu le contrôle de la régulation de la prolifération cellulaire que la capacité à se différencier.

Néanmoins les mécanismes de développement des RMS restent à caractériser. La famille des IMPs et notamment IMP-2, protéines liant les ARN, sont à la fois fortement exprimées dans le muscle en régénération *in vivo* mais aussi dans les cellules de RMS.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence le rôle d'IMP-2 dans la motilité des cellules de RMS et dans les cellules musculaires ainsi que dans le contrôle de l'intégrité du cytosquelette de microtubules (MTs) et dans le remodelage des adhésions focales. En effet, IMP-2 est impliqué à la fois dans la régulation de l'expression de MuRF-3, une protéine lié à la stabilisation des MTs et de Pinch-2, un important médiateur de l'adhésion cellulaire.

Mots Clés : IMP-2, ARN, Myogenèse, MuRf-3, RMS, Pinch-2, régulation post-transcriptionnelle

Abstract

The RNA-binding proteins IMPs (IGF-II mRNA binding protein) first discovered in rhabdomyosarcoma cells (RMS) are expressed during embryonic development but their expression is decreased in adult tissues.

We showed that IMPs and particularly IMP-2 are strongly expressed in mouse myoblasts, during early regeneration of skeletal muscle *in vivo* and in RMS. IMP-2 loss of function experiments using siRNA have shown that IMP-2 is necessary for microtubules stability (MTs), cell motility and invasion of myoblasts and RMS.

Expression of IMP-2 specifically increases MTs stability by an enrichment of detyrosinated tubulin Glu-tubulin. Detyrosination is indispensable for myogenic differentiation and plays substantial role in tumor growth. Additionally, MTs stabilization play an important role in focal adhesion remodeling, in cytoskeleton integrity, cell adhesion and cell motility.

To get new insight into molecular mechanism underlying the function of IMP-2 in MTs stability and cell motility, full transcriptome analysis was performed between IMP-2 knockdown (KD) myoblasts and control myoblasts. We have further shown that IMP-2 controls the mRNA levels of many important mediators of cell adhesion such as PINCH-2, as well as multiple cytoskeleton remodeling, such as MuRF-3.

We have identified a number of functionally relevant protein partners of IMP-2. Moreover subsequent RNAi screens have revealed the importance of IMP-2 regulated transcripts involved in cell motility and cell adhesion

In conclusion, we show that IMP-2 dependent regulation of mRNA such as MuRF3 and PINCH2 largely contributes to the motility –deficient in IMP-2 KD cells. Moreover these results indicate clearly, that further analysis of IMP2 protein partners and RNA targets regulated by IMP-2 will help to characterized the function of IMP-2 and to propose a model of IMP-2 transcriptional regulation of gene expression in myoblasts and RMS cells.

Key words : IMP-2, RNA, Myogenesis, MuRF-3, RMS, Pinch-2, post-transcriptional regulation

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| FIGURE 1. MODELE DU CONTROLE DE LA MYOGENESE SQUELETTIQUE PAR LES <i>MUSCLE REGULATORY FACTORS</i> (MRFS) | 20 |
| FIGURE 2. STRUCTURE DU MUSCLE STRIE. | 22 |
| FIGURE 3. MODELE DE LA MYOGENESE DU MUSCLE SQUELETTIQUE AVEC LES POSSIBLES ORIGINES DES RHABDOMYOSARCOMES. | 30 |
| FIGURE 4 : DOMAINES DE LIAISONS A L'ARN PRESENTS DANS LES RBPS. | 37 |
| FIGURE 5 : LA STRUCTURE DU DOMAINE RRM DE LIAISON A L'ARN. | 39 |
| FIGURE 6 : LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU DOMAINE KH. | 41 |
| FIGURE 7 : LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU DOMAINE ZFD | 43 |
| FIGURE 8 : LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU DOMAINE PAZ DE LA PROTEINE ARGONAUTE-2 | 45 |
| FIGURE 9 : LA POLYADENYLATION DE L'ARNM. | 49 |
| FIGURE 10. MODELE DE LA BIOGENESE ET DE LA REGULATION DE LA REPRESSION POST-TRANSCRIPTIONNELLE PAR LES MIRNAS ET LES SIRNAS. | 61 |
| FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE IGF-II CHEZ L'HOMME. | 41 |
| FIGURE 12. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE DES IMPS ET DES SES ORTHOLOGUES. | 43 |
| FIGURE 13 : SCHEMA REPRESENTANT LA STRUCTURE DU GENE ET DE LA PROTEINE IMP2 | 43 |
| FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ADHESIONS FOCALES (AFS). | 62 |
| FIGURE 15 : SEQUENCE ET STRUCTURE DU DOMAINE LIM. | 63 |
| FIGURE 16 CYCLE DE TYROSINATION ET DE DE-TYROSINATION DE LA TUBULINE. | 72 |
| FIGURE 17 : REGULATION DU TRANSCRIT <i>PINCH-2</i> PAR LES MIRNA. | 76 |
| FIGURE 18 : L'INHIBITION DE L'EXPRESSION D'AGO2 ENTRAINE L'AUGMENTATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE LA PROTEINE <i>PINCH-2</i> | 76 |
| FIGURE 19 : SCHEMA REPRESENTANT LES SITES D'INTERACTIONS PREDITS ENTRE LA REGION 3'UTR DE <i>PINCH-2</i> ET LE MIRNA LET-7 CHEZ LA SOURIS. | 78 |
| FIGURE 20 : L'INHIBITION DE LET-7 ENTRAINE L'AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DU MESSAGER <i>PINCH-2</i> DANS LES C2C12. | 79 |
| FIGURE 21 : SCHEMA REPRESENTANT LA REGION 3'UTR DE <i>PINCH-2</i> FUSIONNEE AU GENE RAPPORTEUR <i>LUCIFERASE</i> . | 80 |
| FIGURE 22 : REGULATION DIRECTE DE L'EXPRESSION DE <i>PINCH-2</i> PAR LET-7. | 82 |

| | |
|---|-----|
| FIGURE 23 : L'INHIBITION DE LET-7 ENTRAINE UN DEFAUT DE MOTILITE DANS LES MYOBLASTES C2C12. | 84 |
| FIGURE 24 : IMMUNO-MARQUAGE DES AFS AVEC UN MARQUEUR PHOSPHO-TYROSINE DANS LES CELLULES C2C12 QUI ONT ETE TRANSFECTEES AVEC DIFFERENTS SIRNA CONTRE IMP-2 OU DES ANTISENS CONTRE LET-7. | 85 |
| FIGURE 25 : CO-IMMUNOMARQUAGE DES GRANULES IMP-2 ET DES P-BODIES DANS LES CELLULES DE RHABDOMYOSARCOMES (RMS). | 87 |
| FIGURE 26 : LET-7 ET IMP-2 REGULENT ENSEMBLE L'EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>PINCH-2</i> . | 88 |
| FIGURE 27 : LET-7 ET IMP-2 INTERVIENNENT TOUS LES DEUX DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>PINCH-2</i> . | 88 |
| FIGURE 28. LE TRANSCRIT <i>IMP-2</i> N'EST PAS REGULE PAR LET-7 DANS LES MYOBLASTES C2C12. | 89 |
| FIGURE 29. SEQUENCES NUCLEOTIDITIQUES DES CIBLES ARNS D'IMP-2. | 97 |
| FIGURE 30 : SCHEMA REPRESENTANT LE MODELE PROPOSE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>PINCH-2</i> PAR IMP-2 ET LET-7 | 106 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| TABLEAU 1. INCIDENCE DE LA SUREXPRESSION (ISE) DES PROTEINES VICKZ DANS DIFFERENTS TYPES DE CANCERS. | 51 |
| TABLEAU 2. EXEMPLES DE FONCTIONS DES PROTEINES VICKZ ASSOCIEES AUX ARNS | 55 |
| TABLEAU 3. EXEMPLES DE CIBLES ARNS DES PROTEINES VICKZ | 58 |
| TABLEAU 4. PARTENAIRES PROTEIQUES INTERAGISSANT AVEC LES PROTEINES VICKZ | 62 |
| TABLEAU 5 : EXEMPLE DES ISOFORMES DES MEMBRES MIRNA DE LA FAMILLE LET-7. | 79 |
| TABLEAU 6 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES MIRNA TROUVES ENRICHIS DANS LES COMPLEXES IMP-2. | 87 |

Liste des abréviations

| | |
|---|--|
| 3'UTR : 3' untranslated region | HMGA2 : High Motility Group A2 |
| 5'UTR : 5'untranslated region | hnRNP : complexes ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires |
| AF : adhésion focale | Igf-II : insulin-like growth factor II |
| Ago : Argonaute | IGF2BP : IGF-II mRNA Binding protein |
| ARE : AU-Rich Element | Igf2r : Récepteur au facteur de croissance igf-II |
| ARMS : Alveolar rhabdomyosarcoma | ILK : Integrin-linked kinase |
| ASH1 : absent small homeotic disks protein I Homolog | IMP : IGF-II mRNA Binding protein 1 |
| BIN1 : Bridging Integrator | IMP-RRE : IMP-RNA Recognition |
| bHLH : basic Helix-Loop-Helix | IRES : Internal Ribosome Entry Site |
| Cdk : cyclin-dependent kinase Element | KH : K-Homology |
| CRD-BP : Coding Region Determinant Binding Protein | KSRP : KH-domain Splicing Regulatory Protein |
| CUGBP1 : CUNG-binding protein 1 | LFS : Syndrome de Li-Fraumeni |
| Dnd1 : Dead end 1 | LNA : Locked nucleic acid |
| dsRBP : double strand RBP | LOH : loss of heterozygosity |
| DM1 : Dystrophie Myotonique de type 1 | LOI : loss of imprinting |
| DMPK : protéine kinase de la dystrophie Myotonique | MADS : MCM1, agamous, déficients, serum response factor |
| DT2 : Diabète de Type 2 | MBNL-1 : Muscleblind-like 1 |
| ER : Réticulum endoplasmique | MCK : Muscle Creatine Kinase |
| ERMS : embryonal rhabdomyosarcoma | MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2 |
| EWS : Ewing Sarcoma | MF : microfilament |
| FKHR : domaine de trans-activation de la protéine Forkhead | MHC : Myosin Heavy Chain |
| FLi-1 : Friend Leukemia integration 1 | miRNA : microRNA |
| FRM1 : X-fragile mental retardation 1 | MPC : Muscle Progenitor Cells |
| FXTAS : Fragile X-associated tremor ataxia Syndrom | MRF : Muscle Regulatory Factors |
| | MT : microtubule |

GFP : Green Fluorescent Protein

MuRF-3 : Muscle-Ring Finger protein 3

NES : Nuclear Export Signal

NLS : Nuclear Localization Signal

NOVA : Neuro-Oncogenical Ventral Antigen

PABP : protéine de liaison aux queues poly(A)

PABN1 : protéine nucléaire de liaison aux queues poly(A)

PAX : paired box

PAZ : Piwi/Argonaute/Zwille

Par-Clip : Photoactivable Ribonucleoside Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation

P-Bodies : Processing Bodies

PINCH-2 : Particularly Interesting New Cys-His Protein-2

Rb : Rétinoblastome

RBD : RNA-Binding Domain

RBP : RNA-Binding Protein

RD : Rhabdomyosarcoma

RISC : RNA-induced silencing complex RISC

RRG : Arginine-Glycine-Glycine

RMS : Rhabdomyosarcomes

RNP : complexe ribonucléoprotéique

siRNA : small interfering RNA

SMA : Spinal Muscular Atrophy

SMN1 : Survival Motoneuron 1

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TET : Translocated in liposarcoma, Ewing's sarcoma

TATA-binding protein-associated protein factor 15

TLS/FUS : TransLocated in Sarcoma/FUsed in Sarcoma

ZBP1 : zipcode-binding protein 1

ZFD : Zing Finger Domain

AVANT-PROPOS

Les cellules peuvent adopter différents états physiologiques comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la sénescence ou encore la quiescence. L'orientation d'une cellule vers l'une ou l'autre de ces voies doit être minutieusement contrôlée. En particulier, l'équilibre prolifération-différenciation de la cellule est fondamental pour la formation des tissus au cours de l'embryogenèse, et pour le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Le mauvais fonctionnement de ce contrôle est à l'origine de défauts de développement ou de pathologies chez l'adulte, en particulier le cancer. L'une des principales thématiques du laboratoire est la compréhension de la régulation de l'équilibre prolifération-différenciation dans la cellule et pour cela le laboratoire a choisi comme modèle d'étude le muscle squelettique strié, où la différenciation terminale est bien caractérisée.

Dans le muscle strié, la prolifération et la différenciation sont mutuellement exclusives : l'arrêt de la prolifération est requis pour permettre aux cellules de s'engager dans le processus de différenciation terminale. La différenciation musculaire peut être explorée *in vivo* au cours de l'embryogenèse ou chez l'adulte en induisant une régénération musculaire locale, ou bien *in vitro* en utilisant des lignées myoblastiques que l'on peut faire différencier *ex vivo*. L'objectif du laboratoire est de reconstituer les voies de régulation de la prolifération et de la différenciation musculaire. Ces études se font aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. L'équipe du Dr Anna Polesskaya que j'ai intégrée s'intéresse plus particulièrement aux facteurs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse comme les petits ARNs non-codants (microARNs) et les protéines de liaisons aux ARN telles que la protéine Lin28. En 2007, le laboratoire a ainsi montré l'importance de ce facteur dans la liaison à l'ARN messager du gène *igf-2* et dans l'augmentation de l'efficacité de la traduction d'*igf-2* au cours de la différenciation musculaire (Polesskaya A, 2007).

Dans la suite de ce travail, nous avons porté notre intérêt sur une protéine partenaire de Lin-28, la protéine IMP-2. Cette protéine appartient à la famille des IMPs qui sont des facteurs importants de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes et qui sont fortement exprimés au cours de l'embryogenèse, mais aussi dans plusieurs cancers, dont les rhabdomyosarcomes. Bien que l'expression des IMPs soit faiblement détectable dans la

plupart des tissus sains adultes (Nielsen J, 1999), la détection de l'expression d'IMP-2 dans le muscle squelettique nous a amenés à nous intéresser au rôle spécifique d'IMP-2 dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse.

Dans cette introduction, je présente dans un premier chapitre les caractéristiques du muscle squelettique utilisé comme modèle d'étude. J'y décris sa structure, la manière dont il se met en place au cours du développement embryonnaire, les facteurs de transcription majeurs impliqués, l'équilibre prolifération-différenciation et je développe le sujet des rhabdomyosarcomes qui correspondent aux tumeurs malignes qui se développent à partir du tissu musculaire squelettique normal.

Dans un deuxième chapitre, je détaille les mécanismes et les facteurs qui sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, notamment au cours de la myogenèse. Je développe le sujet des protéines se liant à l'ARN, les mécanismes d'action de ces protéines et leur spécificité de liaison à l'ARN.

Dans la troisième partie, je présente la famille des IMPs, facteurs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle, et je décris leurs rôles au cours du développement et dans le cancer. Comme il sera décrit plus tard dans mes résultats, pour la première fois, je montre que la protéine IMP-2, initialement non apparentée au muscle strié, joue de fait un rôle clé dans les cellules du muscle squelettique.

Introduction

Chapitre I

Le Muscle Squelettique

I. INTRODUCTION : MODELE D'ÉTUDE, LE MUSCLE STRIÉ

Il existe trois catégories de muscles dans l'organisme : le muscle lisse, le muscle strié cardiaque et le muscle strié squelettique. Bien qu'ils fonctionnent différemment et qu'ils soient innervés par différentes parties du système nerveux, les muscles sont tous constitués de la même unité cellulaire appelée myocyte ou myoblastes.

Les types cellulaires qui constituent le muscle strié

Dans le cas du muscle squelettique strié, trois types de cellules le constituent : les cellules *extra fusales* qui sont majoritaires, les cellules satellites, et les cellules du fuseau neuromusculaire dites *intra fusales*.

A. Les cellules extrafusales ou cellules musculaires striées

Les myotubes, qui constituent les cellules musculaires fonctionnelles, dérivent de cellules progénitrices du muscle encore appelées MPCs *Muscle Progenitor Cells* (MPCs) qui ont pour origines les somites (pour revue) (Tajbakhsh, 2003). Pour donner naissance aux myotubes, ces MPCs vont subir dans un premier temps une étape dite de « détermination » qui va convertir cette population en myoblastes (**figure 1**). Les myoblastes possèdent la capacité à se diviser, mais ne sont plus multipotentes car ces cellules ne peuvent se différencier qu'en muscles, on les appelle des cellules déterminées. Sous l'influence de signaux extérieurs, les myoblastes se différencient, c'est-à-dire qu'ils sortent de manière irréversible du cycle cellulaire et commencent à exprimer des protéines spécifiques comme la créatine kinase musculaire (MCK) ou la chaîne lourde de la myosine (MHC) et vont fusionner entre eux pour donner ainsi naissance à des cellules multinuclées appelées myotubes.

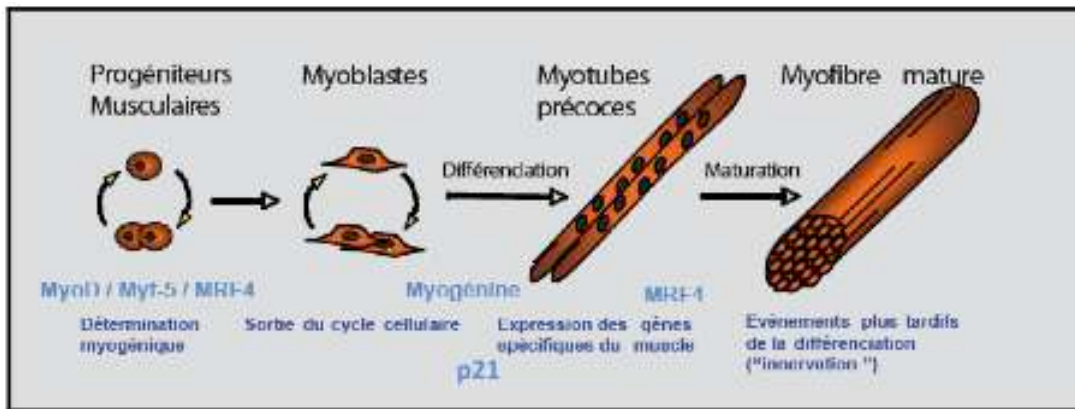


Figure 1. Modèle du contrôle de la myogenèse squelettique par les *Muscle Regulatory factors* (MRFs)

Pendant le développement, les cellules souches mésodermiques s'engagent dans un des multiples lignages cellulaires possibles, notamment dans le lignage musculaire. L'expression de Pax3 et de Pax7 dans les cellules progénitrices contribue à l'expansion myogénique. Après l'induction de MyoD et/ou Myf5, les cellules progénitrices mésodermiques sont engagées dans le lignage musculaire. Plus tard, l'activation des MRFs secondaires (myogénine et MRF4) induit la différenciation musculaire terminale des myoblastes en myocytes. Sous l'influence notamment de p21, les myoblastes vont sortir du cycle cellulaire et commencent à migrer et s'aligner les uns par rapport aux autres. Finalement, la fusion des myocytes donne naissance aux myotubes multinucléés qui subiront une dernière étape de maturation avec notamment leur innervation par le motoneurone, pour donner les myofibres striés. Pendant la phase plus tardive de la myogenèse embryonnaire, une population cellulaire distincte des myoblastes et dérivée des cellules satellites du muscle, fusionne avec la fibre musculaire existante permettant à celle-ci de s'accroître. Certaines cellules satellites restent associées aux myofibres, sous une forme quiescente et dans un état indifférencié.

Figure adaptée de Chargé et Rudnicki, 2004

Enfin ces myotubes vont subir une étape de maturation pour donner des fibres musculaires striées (**figure 1**). Chaque fibre musculaire striée résulte de la fusion de plusieurs dizaines de myoblastes. La fibre musculaire striée présente une forme allongée avec une longueur variable qui peut atteindre plusieurs centimètres et une forme cylindrique avec un diamètre allant de 10 à 100 micromètres, ce qui explique son nom. Chaque fibre individuelle qui forme le muscle squelettique représente une unité de base du système musculaire. Elle contient environ une centaine de noyaux situés en périphérie. La plus grande partie du cytoplasme de ces cellules (appelé également sarcoplasme ou myoplasme) est constituée de milliers de myofibrilles organisées en faisceaux (**figure 2**). Une myofibrille est constituée de petits cylindres allongés dans le sens de la cellule et qui donne son aspect strié à la cellule musculaire squelettique : ces petites unités contractiles sont appelées sarcomères. Ces unités répétitives sont formées par des myofilaments d'actine et de myosine qui sont orientés selon le grand axe de la myofibrille. Dans le cytoplasme restant, se trouve notamment du glycogène, des mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La fibre musculaire est limitée par une membrane plasmique appelée sarcolemme, entourée par une membrane basale.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le processus de différenciation musculaire terminale sans être gêné dans l'interprétation des résultats par des cellules non musculaires, la lignée de myoblastes murins C2C12 a été isolée et caractérisée. Cette lignée est un sous-clone obtenu à partir d'une lignée établie précédemment provenant du muscle de souris (Yaffe D, 1977). Les C2C12 constituent à présent un modèle de référence quant à l'étude de l'équilibre prolifération/différenciation du muscle squelettique strié. Cette lignée a la capacité de se différencier rapidement et aussi produire des myotubes contractiles qui expriment des protéines caractéristiques de la différenciation terminale.

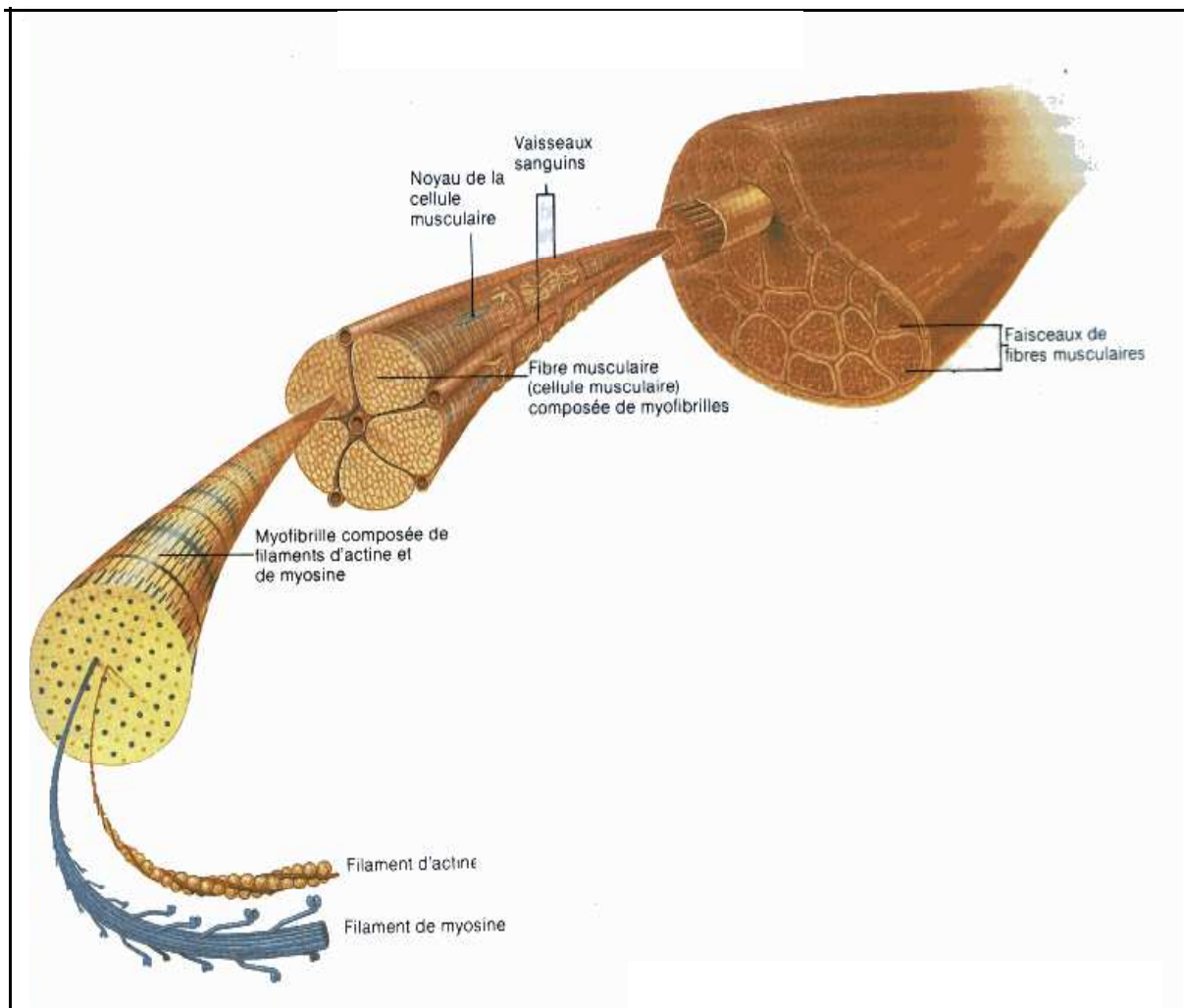


Figure 2. Structure du muscle strié.

Le muscle squelettique est formé de plusieurs faisceaux de fibres musculaires. Chaque faisceau comprend plusieurs milliers de fibres musculaires. Une fibre musculaire résulte de la fusion de plusieurs centaines de cellules musculaires appelées myoblastes. En fusionnant, les myoblastes forment d'abord des myotubes qui sont des cellules multinuclées. Après une étape de maturation, les myotubes deviennent des myofibres. Les myofibres (ou fibres musculaires) sont caractérisées par leur aspect strié.

Image adaptée de http://t.version.free.fr/PHYSIOLOGIE/PHYSIOLOGIE_EXERCICE

B. Les cellules satellites

Les cellules satellites se trouvent entre la lame basale et la fibre musculaire. Elles constituent un véritable réservoir de précurseurs myogéniques indifférenciés et mononuclés qui vont être activés en réponse aux dommages subis par le muscle, induisant ainsi la régénération du muscle squelettique (Pour revue (Seal P, 2000; Seale P, 2000)). La proportion de cellules satellites est très faible par rapport au nombre de noyaux dans une fibre musculaire. Dans le muscle adulte, les cellules satellites ont des rôles multiples. Ainsi, elles interviennent aussi bien lors de l'hypertrophie musculaire liée à l'exercice qu'au cours de la régénération musculaire nécessaire suite à une blessure, à une dénervation ou encore à l'absence de fonctionnement. En effet, bien que les cellules satellites soient quiescentes chez l'adulte, elles peuvent néanmoins retrouver leur capacité à proliférer lors d'un stress ou d'un traumatisme, permettant la croissance et la régénération du muscle.

II. MISE EN PLACE DES MUSCLES SQUELETTIQUES

A. Formation du muscle au cours de l'embryogenèse

Chez les Vertébrés comme les Oiseaux et les Mammifères, la plupart des muscles squelettiques dérivent de cellules progénitrices d'origine mésodermique présentes dans les somites. Lors de la gastrulation, le mésoderme paraxial subit une segmentation en somites qui sont disposés de part et d'autre du tube neural. Ces somites vont subir une première transformation où la région ventrale de ces derniers appelée sclérotome va participer à la formation du cartilage et des os de la colonne vertébrale et des côtes. Alors que la partie dorsale ou dermomyotome va donner naissance entre autres aux muscles squelettiques du corps et des membres (pour revue voir (Buckingham M, 2003)).

B. Régulation génique du développement des muscles

Chez les Mammifères et plus particulièrement la souris où la manipulation génétique rend possible des études fonctionnelles *in vivo*, la régulation moléculaire de la myogenèse a été établie (pour revue voir (Buckingham M, 2001)). Ainsi l'importance des facteurs de la famille MyoD a été montrée, car l'absence de ces facteurs dans les cellules somitiques entraîne à la fois l'adoption d'un autre devenir cellulaire de ces cellules mais également une localisation incorrecte de ces cellules vis à vis des sites habituels de la myogenèse (Tajbakhsh

S, 1996). L'ensemble de ces résultats démontre le rôle primordial de ces protéines comme facteurs déterminants de la myogenèse.

La différenciation des myoblastes en myotubes implique une cascade d'évènements qui vont entraîner de profondes modifications de la cellule tant au niveau morphologique qu'au niveau moléculaire. Ceci implique une modification importante du profil d'expression des gènes des cellules en question, aboutissant à l'inhibition de certains gènes et à l'activation d'autres gènes. Ce mécanisme est contrôlé notamment par l'action coordonnée de plusieurs facteurs de transcription. Ces facteurs cruciaux pour la différenciation terminale appartiennent à la famille des **Muscle Regulatory Factors (MRFs)** comme c'est le cas du facteur MyoD. En effet, l'expression ectopique de MyoD est capable de convertir plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes, les chondrocytes, ou encore les neurones en myoblastes. L'expression forcée de MyoD dans ces cellules va entraîner une sortie du cycle cellulaire, la synthèse de la desmine et de protéines myofibrillaires et l'activation de gènes spécifiques aux muscles comme la *myogénine* et *Myf-5*. L'ensemble de ces données montrent que MyoD est capable d'induire cette re-programmation génique (Choi J, 1990 Weintraub H, 1989; Davis RL, 1987).

C. Les Facteurs régulateurs de la myogenèse (MRF)

La différenciation des cellules musculaires peut être divisée en trois étapes bien séparées dans le temps : la détermination des cellules d'origine mésodermique, la fusion des cellules entre elles et enfin la maturation de celles-ci en fibres musculaires. Toutes ces modifications morphologiques sont accompagnées par des changements finement régulés dans l'expression de gènes spécifiques du programme myogénique (Olson, 1992) . Toutes les étapes de ce processus sont régulées par deux grands groupes de facteurs. Le premier groupe comporte des facteurs de la régulation de la différenciation musculaire MRFs comme :

- MyoD (ou appelé Myf-3), (Davis RL, 1987), (Tapscott SJ, 1988) ,
- Myf-5 (Braun T, 1989),
- la myogénine (Myf-1) (Braun T, 1990; Rhodes, 1989) (Edmondson DG, 1989)
- MRF-4 (nom donné chez le rat mais encore appelé Myf-6 chez l'Homme et herculine chez la souris) (Miner, 1990) (Rhodes, 1989) (Braun T, 1990)

Tous ces membres appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle hélice (**basic Helix-Loop-Helix** ou bHLH). La première étape de la myogenèse est l'engagement des cellules vers un devenir musculaire.

Ces quatre membres de la famille des MRFs ont été identifiés et classés grâce à leur capacité à induire un destin myogénique à des lignées cellulaires non myogéniques. MyoD a été le premier MRF cloné et utilisé dans des expériences de transfection qui ont montré la conversion de plusieurs lignées non myogéniques en myoblastes capables de se différencier en myotubes (Davis RL, 1987). Plus tard d'autres expériences ont permis de mettre en évidence l'importance d'autres membres de la famille des MRFs dans la conversion de cellules en cellules de la lignée myogénique. Il est important de souligner que l'expression ectopique de ces facteurs induit à la fois l'expression de gènes nécessaires à la différenciation musculaire terminale mais peut aussi parfois s'accompagner de la fusion des myoblastes en myotubes.

D. Les protéines MEF2, co-facteurs des MRFs

Le deuxième groupe est constitué d'autres régulateurs transcriptionnels essentiels au programme de la différenciation myogénique appelés *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF2) (Gossett LA, 1989). En effet, les MRFs sont assistés par des co-facteurs de la famille des MEF2 qui vont les aider à induire l'expression de gènes spécifiques du muscle squelettique (Black BL, 1998). La famille MEF2 comprend quatre membres, codés par quatre gènes différents : MEF2A à MEF2D. Alors que l'expression des MRFs est restreinte au muscle, les gènes *Mef2* sont largement exprimés dans les tissus au cours du développement. Ces protéines MEF2 vont se lier à des brins d'ADN riches en séquences AT qui sont retrouvées au niveau de promoteurs de plusieurs gènes muscle-spécifiques (Gossett LA, 1989). Les protéines de la famille MEF2 n'ont pas la capacité en soit d'induire le programme myogénique lorsqu'elles sont surexprimées *in vitro* dans des lignées cellulaires. Néanmoins, plusieurs données appuient l'idée d'un rôle crucial de ces protéines dans la collaboration avec les MRFs (Naidu P, 1995).

L'ensemble de ces protéines régule la transcription de gènes spécifiques du muscle nécessaire à l'instauration de l'identité des myoblastes et au contrôle de la différenciation terminale. MyoD et Myf-5 sont exprimées dans des myoblastes en prolifération alors que l'abondance de myogénine et de p21 (inhibiteur de kinase cdk dépendante du cycle cellulaire) sont caractéristiques de l'étape dans laquelle les myoblastes sont destinés à fusionner et à se différencier en myotubes (Dominov JA, 1998) (Wang J, 1997) (**figure 1**).

E. La différenciation terminale se dissocie en deux étapes discrètes

L'ensemble des recherches effectuées à ce jour sur MyoD, montre que ce dernier est un facteur de transcription capable de transactiver de nombreux gènes nécessaires aux étapes de différenciation musculaire. L'activation de MyoD va entraîner une forte expression de gènes comme la *myogénine*, la *M-cadhérine* ou encore la *créatine kinase musculaire* (pour revue, voir (Berkes CA, 2005)). MyoD va notamment être capable d'orchestrer les deux étapes discrètes de la différenciation terminale : la sortie définitive du cycle prolifératif et l'expression de gènes spécifique de la différenciation musculaire. MyoD fonctionne donc comme un interrupteur moléculaire « en éteignant » la prolifération et en « allumant » la différenciation terminale, et permet ainsi la séparation de ces deux processus.

La sortie du cycle prolifératif

Pendant le processus de différenciation musculaire, les facteurs myogéniques comme MyoD et Myf5, ne sont pas seulement impliqués dans l'induction des gènes spécifiques du muscle, mais également dans la régulation entre l'état prolifératif et la sortie ordonnée du cycle de division cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire est un pré-requis pour que la différenciation musculaire terminale puisse avoir lieu. Cette étape clé de la différenciation du muscle squelettique implique à la fois la diminution des activateurs du cycle cellulaire, comme les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (Cdks), et l'augmentation des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que la protéine du rétinoblastome (Rb), p21, p27 et p57 (Zhang P, 1999). Ainsi, MyoD intervient dans un premier temps au niveau de la sortie du cycle cellulaire en activant notamment les gènes p21, la cycline D3 et Rb. En particulier Rb et p21 jouent un rôle très important dans l'arrêt de la croissance des myoblastes (Novitch BG, 1996; Schneider JW, 1994).

L'activation des gènes spécifiques du muscle

Lors de l'induction *ex vivo* de la différenciation des cellules du muscle squelettique en culture, les myoblastes en prolifération cessent définitivement de se diviser et vont fusionner entre eux pour former des myotubes multinuclés et ainsi induire l'expression de gènes spécifiques du muscle. Plusieurs études indépendantes ont permis d'identifier certains gènes cibles de MyoD. Dans l'une de ces études, la conversion myogénique de fibroblastes a été utilisée comme modèle pour l'analyse du transcriptome de cellules dont la différenciation musculaire a été induite par MyoD (Bergstrom DA, 2002). Les gènes cibles identifiés et

régulés par MyoD sont impliqués dans des fonctions biologiques variées comme la régulation la famille des protéines Six. Cette famille de protéine est impliquée dans l'activation de la transcription du gène de la *myogénine* {Spitz F, 1998 #292}. Parmi les autres gènes régulés par MyoD on retrouve aussi des gènes impliqués dans la structure du muscle comme les troponines I, T3 et C ainsi que des gènes responsables du contrôle du cycle cellulaire par exemple la cycline D1. Simultanément à l'arrêt du cycle cellulaire, MyoD active l'expression d'autres acteurs importants de la différenciation comme la *myogénine* et *Mef2*.

La myogénine intervient en aval de MyoD dans le processus de différenciation ; elle peut aussi entraîner l'activation des gènes de la famille *Mef2*. L'activation de la famille *Mef2* et de la *myogénine* permettrait de prendre le relais de MyoD et/ou de contribuer à la reprogrammation transcriptionnelle des noyaux des myoblastes en cours de différenciation. Plus tard au cours de la différenciation, MyoD de part sa liaison à des éléments régulateurs va participer à l'activation de gènes codant des protéines fonctionnelles du muscle comme la MCK, la troponine I et la MHC qui sont indispensables à la fois à la structure et au fonctionnement des myotubes (Bergstrom DA, 2002; Lassar AB, 1989). MyoD semble également intervenir dans l'expression de gènes codant des protéines d'adhérence comme la cadhérine 15 et de certains intermédiaires de voies de transductions de signaux comme le récepteur au facteur de croissance IGF-II (*igf2r*) (Bergstrom DA, 2002).

III. LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE

Le muscle adulte en régénération partage de nombreuses caractéristiques avec le muscle embryonnaire en différenciation. Les fibres musculaires adultes présentent des niveaux indétectables des protéines MRF à l'exception de MRF4 (Becker C, 2003; Zhou Z, 2001). L'expression des ARNm MRF comme MyoD, Myf-5 et la myogénine et de leurs protéines a été détectée dans le muscle de souris en régénération (Füchtbauer EM, 1992). La régénération du muscle squelettique après une blessure est caractérisée par la prolifération et la différenciation de cellules musculaires précurseurs, suivies de la fusion de celles-ci pour restaurer ou former ainsi de nouvelles fibres musculaires. Une modulation fine de la régulation de la différenciation et de la régénération est ainsi primordiale pour la production de muscle fonctionnel. La présence de défauts de régulation au niveau de ces processus pourrait entraîner l'activation inappropriée de voies de signalisation qui aboutirait à l'apparition de cellules transformées comme par exemple cellules de rhabdomyosarcomes.

IV. LES RHABDOMYOSARCOMES

Les rhabdomyosarcomes (RMS) font partie des tumeurs les plus fréquemment trouvées chez l'enfant. Les deux sous-types de RMS les plus communs sont d'origine embryonnaire (ERMS) et alvéolaire (ARMS).

A. Origines

Epidémiologie

La première description des RMS a été réalisée par Weber en 1854 (Weber, 1854). Cependant la première publication ayant pour objet une étude poussée des RMS a été apportée 92 ans plus tard (Stout 1946). Il s'agit de tumeurs les plus fréquentes chez l'enfant, après le neuroblastome et les tumeurs de Wilms (néphroblastomes) (Kramer S, 1983). L'incidence annuelle est de 1/170000 chez les enfants de moins de 4 ans. Chez les enfants de moins de 15 ans, elle est estimée à 1/244 000. On remarque dans ce type de cancers que les garçons sont plus souvent atteints que les filles (ratio garçon-fille de 1,3 à 1,5) mais jusqu'à présent aucune donnée ne permet d'expliquer cette différence (Wexler L, 1997).

Génétique

Dans la majorité des cas les RMS apparaissent de manière sporadique. En effet, la plupart des enfants atteints de RMS ne présentent pas de facteur de risque connu de développement d'un cancer. Cependant, des études portant sur un examen physique complet des patients ainsi qu'un historique familial ont souligné le rôle d'un facteur génétique sous-jacent dans 10-33 % des cas (Hartley AL, 1993). Le développement des RMS est associé à un certain nombre de syndromes familiaux rares liés au cancer comme le syndrome de Li-Fraumeni (LFS) qui est lié à une mutation germinale dans le gène suppresseur de tumeur *p53* (Malkin D, 1990). Les RMS ont été également observés en association avec le syndrome de Beckwith-Wiedemann qui est caractérisé par une croissance excessive du fœtus associée à des anomalies au niveau de la région du chromosome 11p15 où se trouve le gène du facteur de croissance-2 analogue à l'insuline (IGF-II) (Li M, 1997).

B. Classifications

Les caractéristiques qui permettent de conclure à un diagnostic de RMS doivent apporter la preuve que la tumeur appartient à la lignée du muscle squelettique, soit par son apparence

sous le microscope, soit en immunohistochimie par sa positivité à des marqueurs musculaires comme la desmine ou la myogénine. Bien qu'ils correspondent aux tumeurs mésoenchymateuses malignes, les plus fréquemment observées chez les enfants et les adolescents, leur origine n'est pas encore bien définie (Pappo AS, 1995). Les RMS sont généralement considérés comme des tumeurs du muscle squelettique car ils prennent naissance au niveau de niches proches du muscle mais aussi parce qu'ils partagent des caractéristiques des cellules précurseurs du muscle strié squelettique (Hettmer S, 2010). En microscopie optique les RMS peuvent présenter l'aspect strié caractéristique du muscle. L'utilisation de l'immunomarquage a pu mettre en évidence l'expression de protéines spécifiques du muscle comme MyoD, la myogénine, la desmine. L'expression de facteurs de transcription de la famille de MyoD comme Myf3, Myf4, Myf5 et Myf6 dans les tumeurs de RMS confirme la potentielle origine myogénique (Hosoi H, 1992; Tonin PN, 1991).

Les difficultés rencontrées quant à l'établissement de l'origine des RMS s'expliquent par la variabilité présentée par les sous-types de RMS. Ces cancers sont définis comme des tumeurs hétérogènes et complexes qui se déclinent en plusieurs catégories selon des critères morphologiques et histologiques : les ERMS (embryonal rhabdomyosarcoma) et les ARMS (alveolar rhabdomyosarcoma) sont les deux sous-types histologiques principaux qui présentent des altérations génétiques spécifiques mais distinctes qui sont censées jouer un rôle la tumorigenèse. D'autres variants de RMS d'histologies différentes ont été mis en évidence principalement chez l'adulte où les RMS restent rares (Bergeron C, 2002).

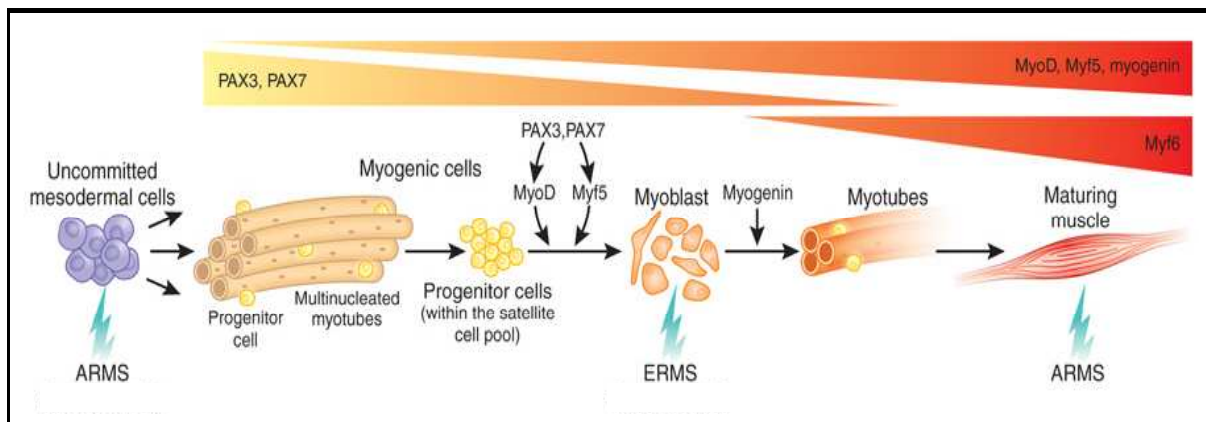


Figure 3. Modèle de la myogenèse du muscle squelettique avec les possibles origines des rhabdomyosarcomes.

La spécification du mésoderme dépend des facteurs de transcription de la myogenèse (comme PAX3, PAX7, MyoD, Myf5, Myf6 et la myogénine). Le maintien du muscle adulte et la régénération font appel à des cellules précurseurs musculaires quiescentes provenant des cellules satellites et qui vont ainsi proliférer, se différencier et leur fusion va entraîner la formation de myotubes multinucléés. En fonction du type d'oncogène exprimé, les cellules MPCs (Muscle Progenitor Cells) peuvent générer des ARMS (alveolar rhabdomyosarcoma), alors que les myoblastes peuvent être à l'origine des ERMS (embryonal rhabdomyosarcoma).

Figure provenant de Hettmer ,2010

Le sous-type alvéolaire ARMS

Ces tumeurs sont très communes ou sont retrouvées communément chez les adolescents et particulièrement au niveau des extrémités et du tronc. Les cellules tumorales sont rondes et de petite taille et sont ainsi nommées à cause de leur ressemblance avec les alvéoles pulmonaires. De nombreux cancers pédiatriques sont associés à des translocations chromosomiques spécifiques. Les analyses cytogénétiques montrent que les ARMS présentent dans 10 % des cas une translocation entre le chromosome 1 et le chromosome 13 (t(1;13)). La plus répandue des translocations quant à elle se situe entre le bras long du chromosome 2 et le bras long du chromosome 13, désignée par t(2;13)(q35;q14) (Turc-Carel C, 1986).

Ces translocations génèrent ainsi une protéine de fusion aux propriétés oncogéniques résultant de la fusion des protéines de liaisons à l'ADN « paired box » PAX, le plus souvent PAX3 pour la t(2;13) et PAX7 pour la t(1;13) et le domaine de trans-activation de la protéine « forkhead » (FKHR) (Shapiro DN, 1993). Le gène PAX3 est impliqué dans la régulation de la transcription au cours du développement neuro-musculaire (pour revue (Buckingham M, 2001)). Bien que la conséquence exacte de cette translocation dans les ARMS reste à élucider, il a été démontré en utilisant des puces à ADN complémentaire que la protéine de fusion PAX-FKHR, exprimée dans des fibroblastes, était responsable de l'activation d'un ensemble de facteurs myogéniques comme la myogénine, MyoD et d'une batterie de gènes impliqués dans la fonction musculaire (Khan J, 1999). Cette nouvelle protéine « hybride » PAX-FKHR pourrait ainsi intervenir dans l'activation inappropriée de gènes pouvant contribuer à ce phénotype transformé. En outre, PAX-FKHR est également responsable de l'augmentation de l'expression d'un récepteur tyrosine kinase, c-MET qui est impliqué dans la transformation (Turc-Carel C, 1986). Ce récepteur est aussi connu pour son rôle dans le contrôle de la motilité et sa capacité invasive dans les cellules épithéliales. La surexpression de c-MET pourrait conférer aux cellules de RMS une capacité de migration similaire à des cellules embryonnaires d'origine musculaire à travers les tissus environnants (Ferracini R, 1995).

Le sous-type embryonnaire ERMS

Les ERMS constituent le sous-type histologique le plus représenté puisqu'il est détecté dans 80% des RMS. Ils apparaissent chez les très jeunes enfants et sont localisés le plus souvent au niveau du cou, de la tête et du tractus uro-génital. Les cellules de ces tumeurs ont

tendance à être plus longues, plus fusiformes que les cellules ARMS. Les ERMS sont connus pour présenter une perte d'hétérozygotie (LOH) concernant le locus 11p15. Au niveau de ce locus, les gènes *igf-II* et *H19* situés présentent une expression monoallélique car soumis à l'empreinte parentale (Scrabble HJ, 1987) (Scrabble H, 1989). En temps normal, seul la copie héritée de l'allèle paternel est transcriptionnellement active alors que la copie maternelle est transcriptionnellement inactive du fait de la méthylation de l'ADN, marque épigénétique de repression. Cette méthylation semble également réprimer un autre gène voisin d'IGF-II soumis à l'empreinte parentale H19 (Hark AT, 2000).

Dans les ERMS, cette LOH a donc pour conséquence une sur-expression du gène IGF-II. Il faut souligner aussi que une surproduction d'IGF-II due à un mécanisme de perte de l'empreinte parentale (LOI) a également été identifiée. Dans ce cas-là, on observe une re-expression d'IGF-II provenant de l'allèle maternel réprimé (Zhan S, 1994). Mais cette surproduction d'IGF-II n'est pas spécifique au type embryonnaire puisqu'elle a été aussi détectée dans le type alvéolaire (pour revue (Krskova L, 2011)).

L'expression des deux copies du gène IGF-II soit par LOH ou LOI semble entraîner un surdosage qui produit un signal de prolifération permettant aux cellules musculaires « cancéreuses » de se développer en dépit des pressions environnementales normales. Des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre le récepteur d'IGF-II inhibent la croissance des RMS. (El-Badry OM, 1990; Kalebic T, 1994). L'ensemble de ces données suggère un rôle potentiel d'IGF-II dans la croissance dérégulée de ces tumeurs.

C. Thérapies

Les approches thérapeutiques des RMS combinent à la fois la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les patients atteints de RMS sont classés en « groupe à risque ». Cette classification repose sur le sous-type histologique des RMS, la localisation et la taille des tumeurs mais aussi l'âge du patient et la présence ou non de métastase. En général, l'élimination permanente de la tumeur « primaire » est réalisée par ablation chirurgicale ou irradiation de la tumeur et des zones voisines. La chimiothérapie est plutôt utilisée dans le cas d'un « contrôle systématique » c'est-à-dire d'un contrôle permanent des « micrométastases ».

D. Conclusions

Les rhabdomyosarcomes constituent des néoplasmes formés de cellules dont les caractéristiques morphologiques et moléculaires s'apparentent aux cellules du muscle strié squelettique. L'expression variable de certaines protéines spécifiques du muscle squelettique comme la desmine ou la myosine et la détection de caractéristiques ultra structurales comme les complexes d'actine/myosine, laisse penser à une nature « myoblastique » des cellules de rhabdomyosarcomes. Bien que de récents essais thérapeutiques combinant à la fois la chirurgie, la chimiothérapie ajoutée à la radiothérapie aient permis d'améliorer le taux de survie des patients atteints de RMS, les résultats pour les patients avec des métastases restent très faibles (Bergeron C, 2002).

Chapitre II

Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes

I. INTRODUCTION

La transcription comme la régulation post-transcriptionnelle sont des mécanismes essentiels qui contribuent à la régulation du profil d'expression de gènes durant différents événements cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la réponse aux stress ou encore la mort cellulaire. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la myogenèse est caractérisée par un arrêt de la prolifération et l'induction de la différenciation musculaire. La majorité des recherches a été concentrée sur la caractérisation de mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la myogenèse par des facteurs clés comme les MRFs (Rhodes, 1989) (Naidu P, 1995). En dépit de la diminution de l'activité transcriptionnelle globale caractéristique de la différenciation terminale du muscle squelettique, il a été détecté un niveau relativement élevé de transcrits mais aussi un maintien du niveau d'expression des protéines dans les myotubes. Ces observations ont permis de souligner l'importance du rôle joué par les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans le développement du muscle et de son maintien. Ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle vont agir sur différentes étapes qui constituent le cycle de vie des ARNs. Dans cette régulation post-transcriptionnelle vont intervenir :

- des éléments cis-régulateurs présents dans l'ARNm
- des facteurs agissant en *trans*

Ces régulations post-transcriptionnelles incluent aussi bien des régulations au niveau de l'épissage de l'ARN pré-messager et de sa maturation que de son transport, de son stockage, et de sa traduction. La stabilité des ARNs et la traduction sont deux processus qui sont

contrôlés par les microRNAs (miRNAs) et des protéines de liaisons aux ARN (RNA-Binding Proteins ou RBPs) (pour revue (Glisovic T, 2008) (Keene JD, 2007)). Ces deux types de facteurs sont capables de recruter les ARNs au niveau de compartiments cytoplasmiques spécialisés dans lesquels les ARNs sont dégradés comme c'est le cas dans les Processing Bodies (P-Bodies) et les exosomes (complexes protéiques capables de dégrader les différents types d'ARNs) (pour revue (Balagopal V, 2009)). Alternativement, les ARNs peuvent subir la répression traductionnelle au niveau des granules de stress ou l'activation traductionnelle au niveau des polysomes (Balagopal V, 2009).

II. RNA-Binding Proteins (RBPs) DANS L'EXPRESSION POST-TRANSCRIPTIONNELLES DES GÈNES

A. Introduction

Les ARNs se retrouvent rarement « sans compagnon » au sein de la cellule. Aussitôt que l'ARN est transcrit, des macromolécules appelés complexes ribonucléoprotéiques (RNPs), contenant des protéines de liaisons à l'ARN (RNA-binding protein ou RBPs) ainsi que des ARNs se constituent sur le transcrit naissant. Ces complexes RNPs participent ainsi au métabolisme des ARNs en influant notamment sur la structure des ARNs, mais jouent aussi un rôle très important dans la biogenèse, la stabilité, la fonction, le transport, la localisation cellulaire ou encore la dégradation (pour revue (Dreyfuss G, 2002)).

B. Structures des RBPs

La découverte de protéines ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires (hnRNP) et d'autres protéines de liaison à l'ARN précurseur ou mature, a mené à l'identification des premiers motifs acides aminés impliqués dans la liaison à l'ARN (Takimoto M, 1993).

Les avancées réalisées dans les techniques de cristallographie dans la dernière décennie ont permis de mettre en évidence la diversité de ces domaines de liaison à l'ARN (*RNA-binding domain* ou *RBD*) mais aussi d'identifier leur structure.

Ces RBD qui caractérisent les RBP sont constitués de 60-100 résidus. Ces domaines peuvent être présents en une ou plusieurs copies et sont souvent associés à l'ARN de manière séquence et structure dépendante (pour revue (Lunde BM, 2007)). Plus d'une quarantaine de RBD ont été identifiés et parmi les plus communs, on retrouve (figure 4) :

- Des domaines de reconnaissance à l'ARN ou « *RNA Recognition Motif* » (RRM)

- Des domaines d'homologie KH
- Des domaines en doigts de zinc ou « *Zinc finger domain* » (ZFD)
- Des domaines Pumilio/FBT
- Des domaines Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ)

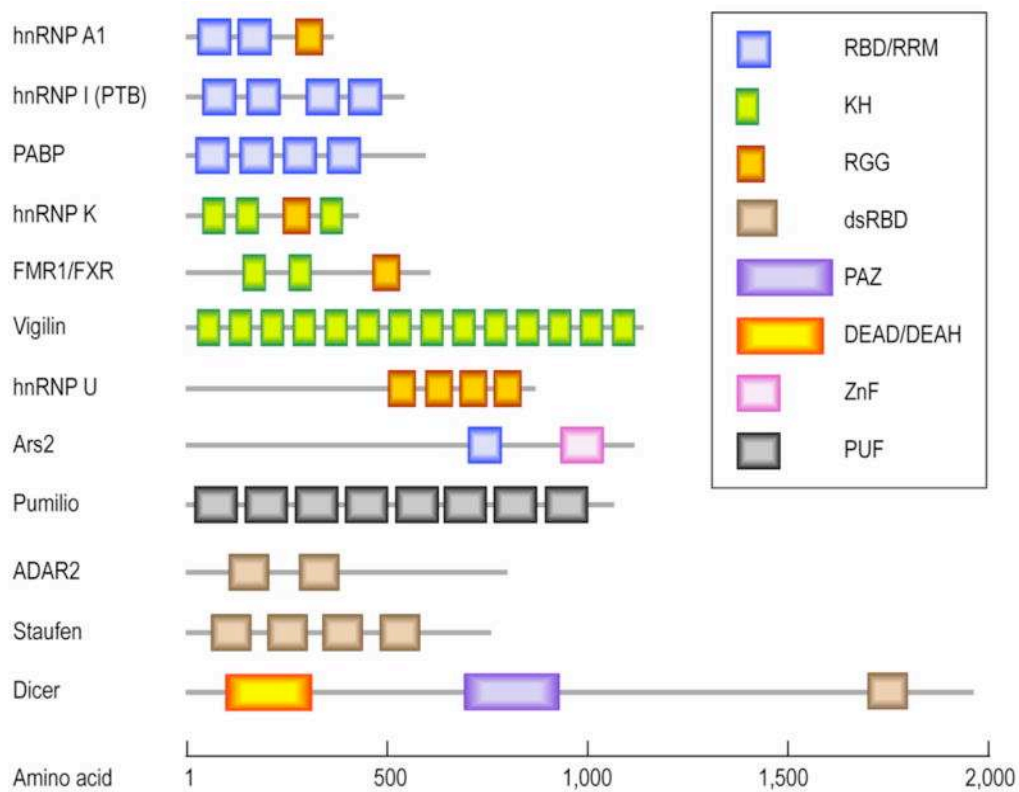


Figure 4 : Domaines de liaisons à l'ARN présents dans les RBPs.

On remarque que certaines d'entre elles comme hnRNP A1, FRM1 et Dicer présentent plusieurs types de domaines de liaison à l'ARN.

Figure provenant de Glisovic et al, 2008

-

Motif de reconnaissance de l'ARN (RRM)

Le motif le plus connu et le mieux caractérisé impliqué dans la liaison à l'ARN est le domaine de reconnaissance à l'ARN (RRM) (Varani G, 1998). Les RRM sont retrouvés aussi bien chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes. Découvert dans les années 1980, ce motif est le plus répandu chez les Eucaryotes et est présent dans plus de 50% des RBPs (Lunde BM, 2007). Chez l'Homme, environ 500 protéines de liaison à l'ARN contenant au moins un RRM ont été identifiées (Maris C, 2005). Dans les protéines eucaryotes, les RRM peuvent être retrouvés en plusieurs copies au sein d'une même protéine (44% de protéines possèdent deux à six domaines RRM) ou alors en compagnie d'un autre type de domaine (21%) (pour revue (Maris C, 2005)). Ce sont des comparaisons biochimiques entre la protéine de liaison à la queue polyA (PABP) et la protéine hnRNP C qui ont permis de proposer une séquence consensus constituée d'acides aminés aromatiques et d'acides aminés chargés positivement nécessaire à la fixation de l'ARN. Les RRM sont constitués en général de 60-80 acides aminés qui forment quatre feuillets anti-parallèles β avec deux hélices α , ce domaine adopte une conformation appelée de type $\alpha\beta$ (Birney E, 1993) (**figure 5**). Le fait de retrouver ces RMM associés à d'autres RBD permet ainsi une modulation de l'affinité de liaison à l'ARN, mais apporte aussi à la fois une spécificité et diversité dans l'interaction avec les ARNs.

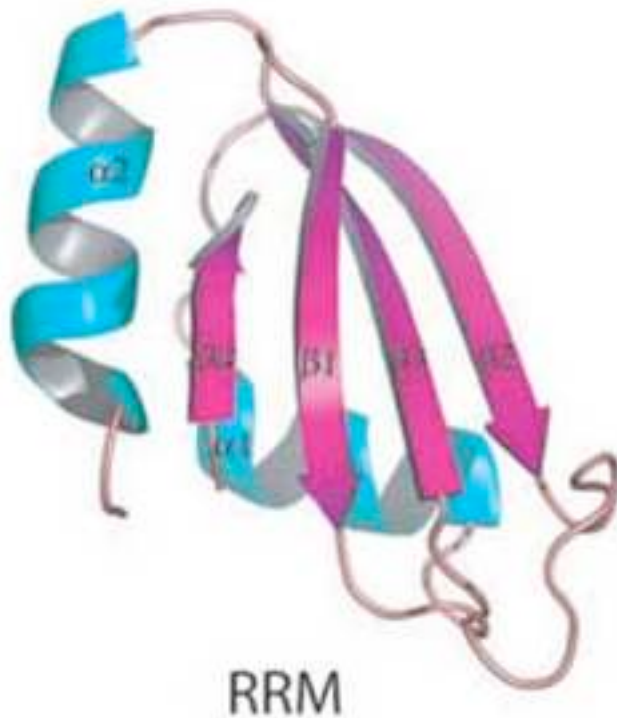


Figure 5 : La structure du domaine RRM de liaison à l'ARN.

Représentation du domaine RRM montrant les feuillets β (en rose) qui interviennent dans les interactions avec les ARNs mais aussi avec les protéines. Les hélices α (en bleu) sont impliquées elles aussi dans les interactions avec les protéines. Cette représentation du domaine RRM provient du facteur d'épissage U2AF65.

Figure provenant de Valcarcel, 2005

Les domaines d'homologie KH

Les domaines d'homologie KH sont des domaines conservés au cours de l'évolution puisqu'on les retrouve dans une grande variété d'organisme allant de la bactérie à l'Homme. Ces domaines ont la particularité de se lier aussi bien à de l'ARN simple brin qu'à l'ARN double brin. Ces domaines ont été identifiés chez l'Homme dans la protéine hnRNP K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) où ils sont répétés. C'est de là que ces domaines tirent leur nom (Takimoto M, 1993).

Ces domaines composés de 70 acides aminés sont physiologiquement très importants. Il a été observé, que dans le cas de la protéine FRM1 (*Fragility Mental Retardation 1*), une mutation de l'Isoleucine en position 304 en Arginine dans le deuxième domaine KH est responsable de l'apparition du syndrome de l'X-fragile (Haruhiko Siomi, 1994, De Boulle K, 1993). La structure secondaire des domaines KH est de type $\alpha\beta$ c'est-à-dire qu'on retrouve la présence de trois feuillets β et de deux hélices α (**figure 6**). Au contraire des RRM, la plateforme de liaison à l'ARN est libre de tout acide aminé aromatique et la reconnaissance de l'ARN se fait alors avec des ponts hydrogènes, des interactions électrostatiques ou encore en adoptant une complémentarité de conformation avec l'ARN.

La propriété commune à toutes les protéines qui présentent des domaines KH est leur implication dans la régulation de l'ARN. Les protéines SF1 ou KSRP (KH type splicing regulatory) impliquées dans la régulation de l'épissage chez les Mammifères présentent quatre domaines KH (Gherzi R, 2004; Peled-Zehavi H, 2001).

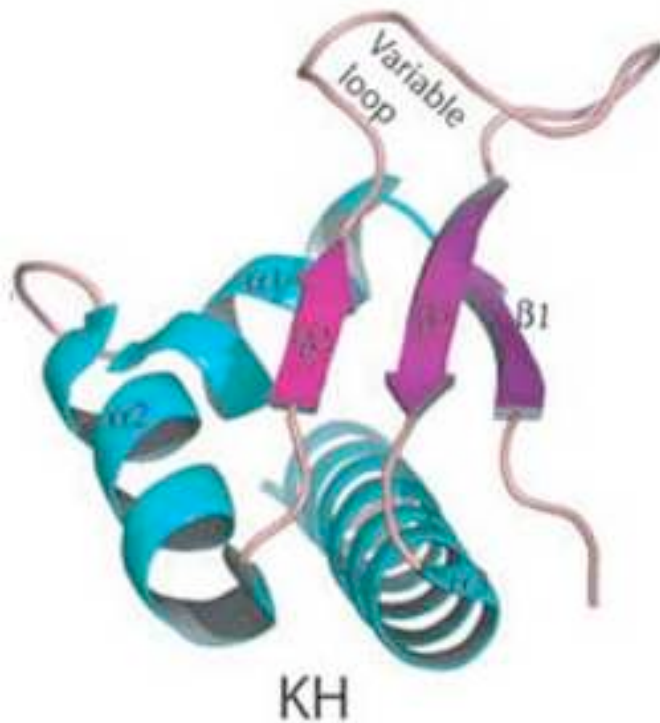


Figure 6 : La structure tridimensionnelle du domaine KH.

Représentation du domaine qui est constitué d'un feuillet β à trois brins (en rose), soutenu d'un côté par deux hélices α (en bleu) et la 3^e hélice. L'ARN se fixe au motif KH en interagissant avec une surface hydrophobe formée par les hélices α et un brin β . La représentation de la structure du domaine KH ci-dessus est celui de la protéine hnRNP K.

Figure provenant de Ravinder & Valcarcel, 2005

Les domaines en doigts de zinc (ZFD)

Avec les RRM et les domaines KH, les domaines en doigts de zinc (ZFD) font partie des trois domaines les plus répandus dans les RBP. Ce domaine ZFD est classiquement trouvé dans des protéines qui interagissent avec l'ADN, mais on le retrouve aussi dans les RBPs.

Il existe plusieurs types de ZFD, le plus commun a pour nomenclature C_2H_2 où C représente un résidu Cystéine et l'H un résidu Histidine. Les ZFD de type C_2H_2 sont constitués d'un premier doigt de zinc où les deux résidus Cystéines sont coordonnés avec un atome de zinc et l'autre doigt présente deux résidus Histidine coordonnés avec le même atome de zinc (**figure 7**). Ces domaines ont été identifiés la première fois dans le facteur de transcription TFIIIA (Transcription factor IIIA). Ce facteur de transcription ne possède pas moins de neuf ZFD dont cinq interagissent avec l'ADN et les quatre autres avec l'ARN 5S (Stefi R, 2005). Dans le cas de TFIIIA, les interactions avec l'ADN se font principalement via des ponts d'hydrogènes avec les bases qui reconnaissent les hélices α tandis que TFIIIA se lie avec l'ARN en créant des contacts spécifiques avec deux boucles ARNs à travers la reconnaissance d'hélices contenues dans les ZFD. Les ZFD utilisent donc les mêmes résidus indépendamment de la nature de l'acide nucléique lié, mais ce sont les structures différentes de l'ADN et de l'ARN qui dictent l'arrangement des structures des ZFD (Stefi R, 2005).

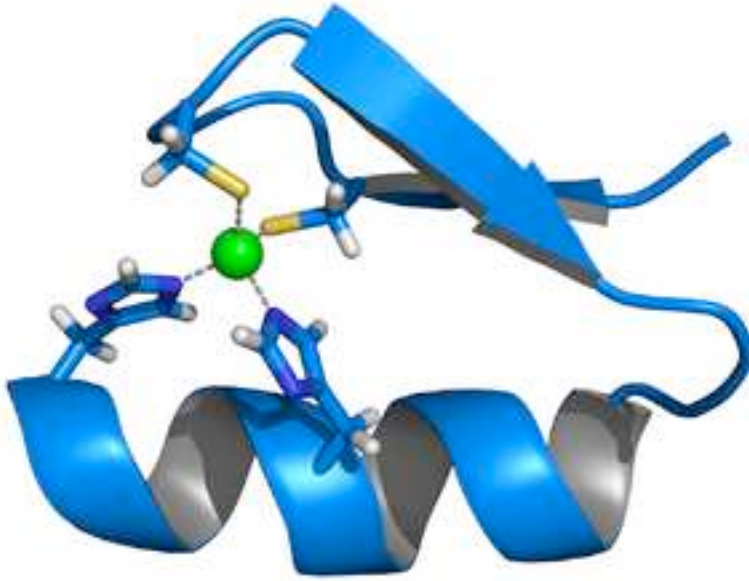


Figure 7 : La structure tridimensionnelle du domaine ZFD

Représentation du motif ZFD qui consiste en trois structures secondaires : une hélice α et deux feuilletts β antiparallèles. Ces structures forment un faisceau en forme de doigt, maintenu par un ion zinc (en vert). L'atome de zinc (en vert) est coordonné par deux résidus Histidine et deux résidus Cystéine.

Figure provenant de http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger

Les domaines PAZ

La biogenèse des miRNA (voir paragraphe sur les miRNA) et des *small interfering RNAs* (siRNAs) génère des petits ARNs avec des caractéristiques chimiques et structurales particulières. Ces caractéristiques sont apportées par une série de domaines qu'on rencontre dans des protéines impliquées dans les voies de régulation par les petits ARNs.

Ces domaines appelés PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) sont constitués d'environ 110 acides aminés et vont reconnaître de manière spécifique les deux nucléotides protubérants situés à l'extrémité 3' du précurseur du miRNA (**figure 8**). Ces domaines PAZ sont retrouvés dans les protéines Ago (Argonaute). Cette famille de protéines est caractérisée par la présence de deux domaines PAZ et Piwi. Chez les Mammifères, la protéine Ago2 fournit l'essentiel de l'activité catalytique dans les différentes voies d'ARNi (ARN interférence) (pour revue (Kim VN, 2009)). Les domaines PAZ dans les protéines Ago faciliteraient le clivage du brin cible par le complexe RISC, ce qui résulterait en la dégradation de l'ARNm complémentaire du petit ARN. La présence des domaines Piwi contenus dans les protéines Ago permet d'adopter aux protéines une conformation de type RNase H et cela permettrait d'ancrer l'extrémité 5' du brin guide afin de situer correctement le brin cible qui sera ensuite dégradé.

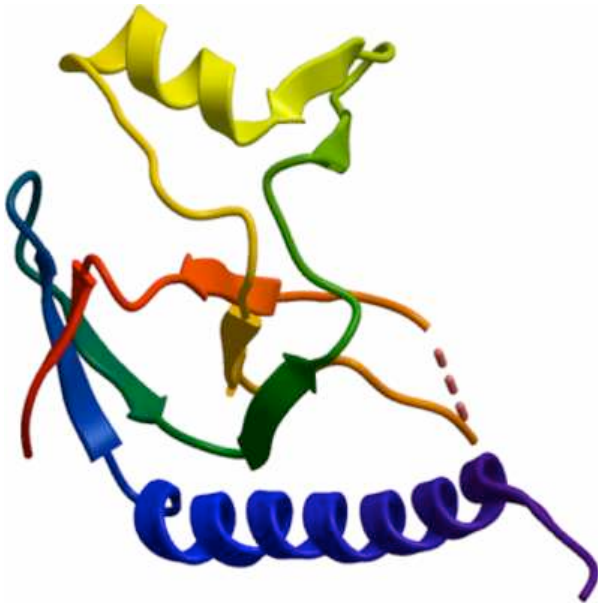


Figure 8 : La structure tridimensionnelle du domaine PAZ de la protéine Argonaute-2

Le domaine PAZ a été identifié comme domaine de liaison à l'ARN et il intervient dans la liaison avec les deux nucléotides situés sur l'extrémité 3' du précurseur du miRNA. Le domaine PAZ consiste en huit feuillets β et deux hélices α .

Figure provenant de <http://www.thesgc.org/structures/details?pdbid=3QIR/>

Conclusion

L'existence de peu de domaines d'interactions avec l'ARN pourrait laisser suggérer une faible hétérogénéité dans les fonctions associées aux protéines RBP. Au contraire, les multiples combinaisons de RBD dans ces protéines leur permettent d'une part de s'adapter à la grande variété d'ARNs et d'autre part d'étendre leur répertoire fonctionnel.

C. Fonctions des RBPs

Les RBPs sont des protéines impliquées dans tous les aspects de la biologie des ARNs allant de la transcription, l'épissage des précurseurs des ARN messagers (pré-ARNm), leur polyadénylation à la modification des ARN, leur transport, leur localisation, leur traduction ou encore leur dégradation. Les RBPs n'influencent pas uniquement l'ensemble de ces événements indépendamment, mais établissent aussi un lien entre eux (Kyburz A, 2006; Rigo F, 2009).

L'épissage alternatif

Chez l'Homme, au moins 75% des gènes expriment des copies différentes d'ARNm grâce à l'épissage alternatif (Johnson JM, 2003). Les RBPs participent également à ce mécanisme-. Ainsi les protéines NOVA (Neuro-Oncogenical Ventral Antigen), qui sont exprimées de manière spécifique dans les neurones (Jensen KB, 2000), contiennent trois domaines KH impliqués dans l'épissage alternatif d'une série de pré-ARNm, grâce à la reconnaissance d'éléments YCAY (où Y correspond à une pyrimidine) contenus dans leurs introns (Buckanovich RJ, 1997). Dans le cas de la protéine NOVA-1, celle-ci va réguler l'épissage alternatif des pré-ARNm spécifiques aux neurones comme par exemple le gène du récepteur GABAA gamma 2 (Ashiya M, 1995).

Modification de l'ARN

Le terme « édition » ou « retouche » de l'ARN messenger décrit l'ensemble des processus moléculaires dans lesquelles l'information contenue dans la séquence de l'ARN est modifiée. De telles modifications sont observées au niveau des ARNs chez les Eucaryotes et elles peuvent se faire lors de la transcription ou de manière post-transcriptionnelle. Ces mécanismes peuvent se dérouler à la fois dans le noyau et dans les mitochondries (pour revue (Brennicke A, 1999b)). Il existe une diversité dans les mécanismes d'édition qui inclut des modifications de nucléosides comme la transformation de cytosine en uridine ou l'adénosine en inosine par désamination ou encore l'insertion ou la délétion de nucléoside (Brennicke A, 1999a). L'édition fait intervenir des protéines de liaisons à l'ARN telle que la protéine *adenosine deaminase acting on RNA* (ADAR) (Valente L, 2005). Un exemple de désamination est le cas de l'ARNm du récepteur du glutamate GluR-B où la désamination entraîne la conversion de la Glutamine en Arginine. Cette modification change les propriétés conductrices dans les canaux altérés (Higushi M, 1993). Un autre exemple de l'importance de la désamination par les protéines membres de la famille ADAR est leur rôle dans la modulation de la biogenèse de certains miRNAs (Kawahara Y, 2007). La désamination du précurseur du miR-142 spécifiquement exprimé dans les tissus hématopoiétiques par les protéines ADAR1 et ADAR2 va affecter la maturation de ce miRNA par Drosha (Habig JW, 2007). Il a été montré que la désamination va avoir lieu au niveau de site de clivage du précurseur du miR-142 par Drosha et a pour conséquence une inhibition du clivage du

précurseur du miR-142 qui va ensuite être dégradé par la ribonucléase Tudor-SN présente dans le complexe RISC (Yang W, 2006).

Polyadénylation de l'ARNm dans le noyau

La polyadénylation est aussi un phénomène dépendant des RBPs qui est crucial puisqu'il est important pour les ARNs au niveau de leur transport nucléaire, de leur stabilité mais aussi pour leur traduction. Chez les Eucaryotes, à l'exception de l'ARNm des histones, les ARNm sont maturés par l'ajout d'une queue dite « poly(A) » de 200 nucléotides (pour revue (MunroeD, 1990)). La polyadénylation est un processus finement régulé qui consiste en deux étapes. La première étape correspond au clivage du transcrit entre la séquence conservée AAUAAA localisée dans la région 3'UTR et la séquence riche en U/GU située à quelques dizaine de nucléotides en aval. La seconde étape correspond à l'ajout de la queue poly(A) au produit de clivage par la polymérase poly(A) (MunroeD, 1990). Le complexe CPSF (Cleavage-Polyadénylation Specificity Factor) est un complexe protéique nécessaire pour la polyadénylation qui se lie à la séquence AAUAAA et qui est formé par les sous-unités CPSF-160 et CPSF-30 qui sont des protéines RBPs (Danckwardt S, 2008). Ce complexe CPSF s'associe à la protéine nucléaire de liaison au signal poly(A) (PABPN1) qui ensemble vont stimuler la polymérase poly(A) (Danckwardt S, 2008) (**figure 9**).

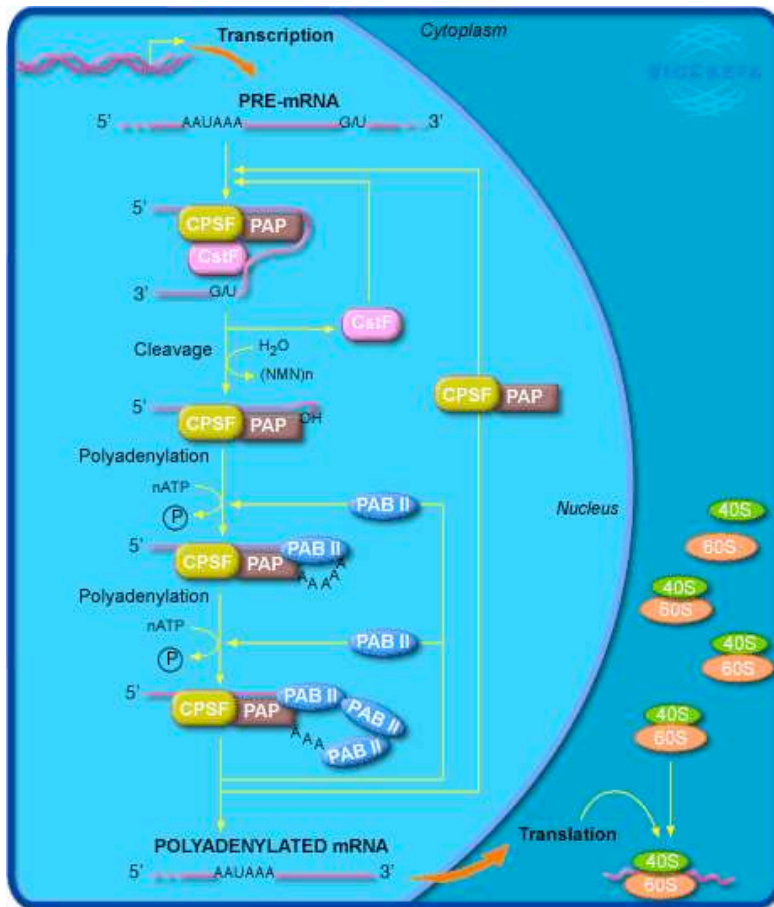


Figure 9 : La polyadénylation de l'ARNm.

Représentation schématique de l'ensemble des étapes impliquées dans la polyadénylation de l'ARNm. L'extrémité 3' de la plupart des ARNm eucaryotiques est polyadénylée. Une fois la transcription achevée, l'ARNm sera clivé de 15-30 nucléotides, puis une queue poly(A) sera ajoutée. Cette polyadénylation facilite l'exportation de l'ARNm hors du noyau, le protège des dégradations une fois dans le cytosol et facilite sa traduction.

Figure provenant de http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/Pathways/BioCarta/h_cpsfPathway/

Export de l'ARN

Une fois la maturation de l'ARNm complète, l'ARNm prêt à être traduit est exporté hors du noyau vers le cytoplasme. Avant que cet ARNm soit exporté, la cellule va vérifier que l'ensemble des modifications se sont déroulées correctement. Cet export peut se résumer en trois étapes : tout d'abord un complexe cargo se forme au sein du noyau puis il est suivi par la translocation de ce complexe dans le pore nucléaire puis ce cargo est relâché dans le cytoplasme où il sera recyclé. L'export des ARNm fait intervenir une voie qui pourrait être différente de celles utilisées pour l'export des protéines et des autres ARNs. La plupart des transports nucléo-cytoplasmiques des protéines et des ARN de transfert (ARNt) font intervenir une seule famille de récepteurs de transports hors du noyau (pour revue (Nakielny S, 1993)). Les membres de cette famille partagent un co-facteur clé qui est la petite protéine GTPase Ran.

Un important facteur qui intervient dans l'export des ARNm appelé TAP chez les Vertébrés et Mex67 chez *S. cerevisiae* n'appartient pas à la famille de récepteurs impliqués dans le transport des protéines et des ARNt. Cette protéine conservée interagit avec les RNPs et le complexe du pore nucléaire et fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Segref, 1997, Tan, 2000, Braun IC, 1999).

D'autres protéines pourraient avoir un rôle dans l'export de l'ARNm notamment les protéines qui font la navette entre le cytoplasme et le noyau comme hnRNP A1 et HuR (Visa N, 1996). L'utilisation de peptides qui inhibent la perméabilité cellulaire a permis à Galloutzi et Steitz de montrer qu'ils existent plusieurs voies d'export des ARNm qui font intervenir hnRNP A1 et HuR.

Localisation de l'ARN

La localisation subcellulaire de l'ARNm grâce à certaines protéines de liaison à l'ARN permet une traduction localisée de protéines spécifiques (pour revue (Holt CE, 2009)). Ce mécanisme a pour avantage de permettre la synthèse de protéines en un endroit spécifique et ainsi de réguler localement l'expression de certaines protéines.

Un parfait exemple qui souligne comment des RBP peuvent influencer sur la localisation cytoplasmique des ARN est l'exemple de l'ARNm de la β -actine (Ross AF et al, 1997). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm de la β -actine est localisé au niveau du front de migration des lamellipodes des cellules qui migrent comme les fibroblastes (Sundell CL, 1990). De plus, la localisation de l'ARNm de la β -actine est corrélée avec la

localisation de la protéine β -actine au niveau de structures apicales comme les microvillosités des cellules épithéliales et des cellules ciliées de l'oreille et au niveau du front de migration des cellules qui migrent comme les fibroblastes. La localisation de l'ARNm de la β -actine au niveau des lamellipodes est possible grâce à son interaction avec la zipcode-binding protein 1 (ZBP1). Cette protéine ZBP constituée de quatre domaines KH et d'un domaine RRM se lie au cours de la transcription du gène de la β -actine au niveau d'un signal de localisation appelé « zipcode » de 54 nucléotides situé dans la région 3'UTR de l'ARNm. Cette interaction est essentielle pour la localisation correcte de l'ARNm de la β -actine et de sa protéine dans le cytoplasme (pour revue (Hüttelmaier S, 2005)).

Traduction de l'ARN

La régulation de la traduction fournit un mécanisme qui permet de contrôler le niveau d'expression des gènes indépendamment de la transcription. Cette régulation peut être couplée au mécanisme de régulation de la localisation de l'ARNm. C'est d'ailleurs ce qui est observé dans le cas de la régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine. La protéine ZBP1 qui joue un rôle dans la localisation de l'ARN de la β -actine est aussi impliquée dans la répression de la traduction de cet ARNm en bloquant l'étape d'initiation (Hüttelmaier S, 2005). La phosphorylation de ZBP1 par la tyrosine kinase Src mène à une diminution de l'affinité de ZBP1 pour l'ARNm de la β -actine, ce qui a pour conséquence la levée de la répression de la traduction (Hüttelmaier S, 2005).

On observe une régulation de la traduction qui permet de garder inactifs des gènes aux cours des différentes étapes de développement. Ainsi, dans la lignée germinale de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), la protéine GDL-1 réprime la traduction de l'ARNm du gène *pal-1* en se liant au niveau de l'élément *germline repression element* (GRE) situé au niveau du 3'UTR de cet ARNm (Mootz D, 2004). La protéine PAL-1 initie la transcription d'un ensemble de gènes nécessaires à des étapes tardives de la différenciation germinale ; son expression précoce dans les oocytes est ainsi réprimée (Evans TC, 2005).

Stabilisation de l'ARN

La synthèse des protéines dépend de l'équilibre entre la dégradation et la stabilisation des transcrits. Par exemple dans les neurones, les protéines de la famille ELAV/Hu (embryonic lethal abnormal vision chez la drosophile) sont connues pour être impliquées dans la stabilité et la traduction de transcrits riches en séquences AU (Keene, 1999). Chacune de

ces protéines Hu possèdent trois RRM. Deux RRM sont impliquées dans la liaison à des éléments riches en séquences AU (AREs) et de cette interaction résulte la stabilisation des différents transcrits comme *c-fos* ou *EGF* (Keene, 1999). Un autre membre de la cette famille, la protéine HuR (Human antigen R) apparaît stabiliser ses transcrits cibles en les protégeant contre une dégradation dans le cytoplasme (Peng SS, 1998). HuR intervient dans différentes étapes du métabolisme de l'ARN comme le transport nucléo-cytoplasmique, l'épissage, la traduction ou encore la dégradation de l'ARNm (Hinman, 2008). Il a été montré que HuR colocalisait avec des polysomes ce qui suggère qu'elle pourrait lier des ARNm en cours de traduction (Gallouzi IE, 2000).

III. ÉLÉMENTS CIS-RÉGULATEURS PRÉSENTS EN 3' UTR

Ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle se font grâce à la présence d'éléments cis-régulateurs qui sont localisés au niveau de la séquence codante et au niveau des régions 5' et 3'UTR. Dans les paragraphes suivants nous nous concentrerons sur la région 3'UTR qui joue un rôle important dans la traduction, la localisation et la stabilisation de l'ARNm via la régulation par des RBPs. Cette région 3' UTR porte également des sites de régulation par les miRNAs appelées séquences « seed ».

Les éléments agissant en *cis* correspondent à des séquences présentes dans les ARNm et qui vont influencer leur stabilité et/ ou la traduction grâce à la liaison de certains facteurs. Au niveau de l'extrémité 5' des transcrits, la coiffe est connue pour son rôle dans la régulation de la traduction en collaboration avec la queue poly(A) située à l'extrémité de la région 3'UTR (Wickens, 1998). La coiffe joue plusieurs rôles : elle protège les ARNs contre la dégradation par des ribonucléases, et après l'export des ARNs dans le cytoplasme, elle permet de recruter les ribosomes qui vont ainsi traduire l'ARNm. La traduction des ARNm peut également s'effectuer indépendamment de la coiffe via les séquences IRES (Internal Ribosome Entry Site) (pour revue (Vagner S, 2001)) qui permettent le recrutement direct du ribosome au niveau du codon d'initiation de la traduction indépendamment de la présence de la coiffe et du mécanisme de scanneur de l'ARNm. La région 3'UTR est connue pour son rôle dans la régulation de la demi-vie des ARNm due à la présence d'éléments déstabilisateurs. Un de ces éléments les mieux caractérisés est l'élément AU-rich (AU-Rich Element ou ARE), séquence qui est liée par de nombreuses RBPs (pour revue {Bevilacqua A, 2003 #313}).

A. Les AREs médiateurs de la stabilité des ARNm

Les AREs correspondent aux éléments agissant *in cis* les mieux caractérisés et qui sont impliqués dans la dégradation rapide des ARNm chez les Mammifères mais également chez la levure et le nématode. Ces séquences d'environ 50 à 150 nucléotides favorisent le processus de déadénylation des ARNm contenant des AREs et vont ainsi induire leur dégradation. Ces séquences localisées au niveau de la région des 3'UTR des transcrits sont retrouvées dans environ 5 à 8 % des ARNm chez l'Homme (Peng SS, 1998). Il a été observé que ces AREs pouvaient interagir avec de nombreuses RBPs qui vont affecter de manière positive ou négative le métabolisme des ARNs. On retrouve plus fréquemment sur des ARNm dont la durée de vie est courte, tels que les transcrits qui codent des cytokines, des proto-oncogènes ou encore certains facteurs de transcription.

Comme leur nom l'indique, ces séquences AREs se définissent par la présence d'un enrichissement de nucléotides constitué d'une forte concentration en adénine (A) et uracile (U) et sont du type AU₃A. Les ARNm qui présentent des séquences AREs sont classés en plusieurs catégories selon leurs cinétiques de dégradation et de déadénylation et également sur le nombre de répétitions dans la région 3'UTR du motif AU₃A (Bakheet T 2001). Ce motif ne confère pas nécessairement une demi-vie courte aux ARNs qui le portent mais suggèrent que son « environnement » nucléotidique est également important (Bakheet T 2001).

Les AREs sont le plus souvent retrouvés dans des transcrits qui sont instables. Comme la plupart de ces ARNm codent des facteurs de croissance et de différenciation, leur dégradation rapide est cruciale afin de maintenir une concentration faible de ces protéines dans le but de protéger les cellules d'une croissance incontrôlée. Il a été notamment montré que la perte de ces éléments ou la présence de mutation est associée à l'apparition de phénotypes transformés. Par exemple, le retrait de la séquence ARE située dans la région 3'UTR de l'ARNm *c-fos* mène à l'augmentation du caractère oncogène du gène *c-fos* (Bakheet T 2001). Certaines maladies liées au développement tumoral comme les neuroblastomes sont liées à une augmentation significative dans la demi-vie des ARNm *c-myc* et *c-fos*, une augmentation due à la présence de mutations dans leurs AREs.

Des expériences *in vitro* de dégradation de l'ARN ont permis de démontrer que chez les Mammifères, l'exosome (complexe protéique capable de dégrader les ARNs) était

responsable de la dégradation de l'ARNm. Chez l'Homme, ce sont des protéines qui se lient aux séquences AREs qui pourraient être responsable du recrutement de l'exosome. Néanmoins, ces séquences AREs ne « ciblent » pas toujours l'ARNm pour le dégrader. En effet, les protéines de liaison aux AREs peuvent également jouer un rôle de stabilisateur de ces ARNm comme c'est le cas de la protéine HuR qui stabilise les ARNm des cyclines A et B1 (Wang W, 2000). Mais ces séquences peuvent servir à la fois également de sites de liaison à des RBPs qui vont ainsi réguler la localisation cellulaire de ces ARNm ainsi que des sites de liaison aux miRNAs. Ces exemples montrent l'importance de garder les transcrits contenant des AREs sous dépendance d'une régulation très fine.

B. Les RBPs et la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse

Bien que de nombreuses RBPs aient été identifiées et qu'elles jouent un rôle clé dans le métabolisme des ARNs, très peu de RBPs ont été spécifiquement décrites dans le cas de la myogenèse. Néanmoins, l'altération de ces protéines est liée à des phénotypes musculaires. Ainsi, certaines de ces protéines présentent : (i) des altérations au niveau de leur expression comme c'est le cas de la protéine CUGBP1 (CUG-binding protein 1) dans la dystrophie myotonique de type 1 (Schoser B, 2010), ou encore (ii) des mutations dans les gènes qui les codent, comme la protéine de liaison à la queue poly A PABPN1 dont le gène est muté dans la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP) (Abu-Baker A, 2007).

Les AREs qui vont intervenir dans la dégradation des ARNm semblent jouer un rôle important dans le processus de différenciation musculaire des cellules. Les facteurs clés myogénique comme MyoD, myogénine et p21 contiennent tous des séquences AU-riches dans leur 3'UTR (Bakheet T 2001). Ces facteurs sont connus pour avoir une demi-vie très courte, une manière de réguler leur expression au cours de la différenciation. Lors de la différenciation musculaire, l'augmentation de l'expression de la myogénine observée ne peut pas être uniquement expliquée par l'augmentation de la transcription de son gène. Ce constat laisse penser que les AREs sont impliqués dans la régulation de la surexpression de ces messagers lors de l'induction de la différenciation musculaire. Comme les AREs sont connus pour être des acteurs majeurs des voies de régulations post-transcriptionnelles, la présence de ces séquences dans des facteurs myogéniques aussi cruciaux, renforce l'hypothèse selon laquelle la régulation post-transcriptionnelle est un mécanisme important dans le contrôle de la myogenèse.

La protéine HuR

La protéine HuR (pour revue (Brennan CM, 2001)) constitue un excellent exemple de facteur impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse grâce à son action de stabilisation des ARNm codant des facteurs myogéniques. Il semblerait que la fonction de la protéine HuR est dépendante de sa localisation nucléo-cytoplasmique qui pourrait jouer un rôle primordial au cours de la myogenèse (pour revue (Von Roretz C, 2011)). La protéine HuR qui possède trois domaines RRM hautement conservés, réside de manière prédominante dans le noyau. Elle fait la navette vers le cytoplasme en transportant des ARNs dont la région 3' UTR comporte des séquences AU (Von Roretz C, 2011). Dans les myoblastes en prolifération, la protéine HuR est presque exclusivement nucléaire. De manière intéressante, au cours de la différenciation, celle-ci présente une accumulation cytoplasmique (Figuroa A, 2003). En effet, il a été montré qu'au cours des étapes précoces de la différenciation musculaire l'import nucléaire de HuR était assuré par le facteur TRN2 (Transportin-2-mediated nuclear import) (Beauchamp P, 2010). Lors de la fusion des myoblastes en myotubes, HuR devient cytoplasmique (Brennan CM, 2001) (Figuroa A, 2003). À ce stade, HuR est clivé par les caspases et ce clivage va entraîner la formation d'un fragment appelé HuR-CP1 qui va inhiber l'import nucléaire de la protéine HuR réalisé par TRN2 (Beauchamp P, 2010). À partir de là se constitue une compétition entre les formes HuR et HuR-CP1 afin de former un complexe stable TRN2. Cette compétition va être responsable de l'accumulation cytoplasmique de la protéine HuR qui aura pour conséquence la stabilisation de plusieurs ARNm comme la myogénine et MyoD dont les niveaux d'expression protéique vont être augmentés, en favorisant ainsi la différenciation musculaire. Des expériences de perte de fonction de la protéine HuR dans les myoblastes ont mis en évidence la diminution de l'expression de la myogénine et de MyoD qui s'accompagne d'une inhibition de la différenciation musculaire (Von Roretz C, 2011). Tous ces résultats révèlent donc un rôle primordial de HuR dans la différenciation musculaire.

Une des conditions pour que la différenciation musculaire puisse s'établir est la sortie de manière irréversible du cycle cellulaire (Guo K, 1995). Il semblerait que la protéine HuR soit également impliquée dans cette étape clé de la myogenèse. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, une des protéines clé qui contrôlent la sortie du cycle cellulaire est l'inhibiteur de kinase dépendante du cycle cellulaire, la protéine p21 (Guo K, 1995). La

transcription de cette protéine est induite par le facteur MyoD, et l'ARNm de *p21* qui présente des séquences ARE est stabilisé par la protéine HuR (Figueroa A, 2003). Il a été montré que lors de la différenciation musculaire HuR s'associe avec p21 et que la surexpression de la protéine HuR avait pour conséquence l'augmentation du niveau d'expression de p21 et une accélération dans la mise en place de la différenciation musculaire. L'ensemble de ces données ont permis de souligner l'importance de HuR dans la sortie du cycle cellulaire via la régulation de p21.

Cependant, il semblerait que la protéine HuR aurait également un rôle dans le maintien de l'état de prolifération dans les myoblastes. Il a été mis en évidence une interaction entre HuR et l'ARNm de la cycline D1 (Lal A, 2004). À cette stabilisation s'ajoute celle apportée par la liaison d'un autre facteur appelé Pitx2 (Gherzi R, 2010). La phosphorylation de ce facteur au cours de la différenciation entraîne la dissociation du complexe cycline D1/HuR/Pitx2 qui va induire la déstabilisation de l'ARNm de la cycline D1 et donc un arrêt du cycle cellulaire (Gherzi R, 2010).

La protéine KSRP

D'autres protéines de liaison aux séquences ARE, telles que la protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein), sont considérées comme des déstabilisateurs des ARNm (pour revue (Briata P, 2011)). Ces protéines peuvent entraîner la dégradation de leurs ARNm cibles en induisant leur déadénylation ainsi qu'en recrutant les exosomes (Briata P, 2011). La protéine KSRP, qui a été initialement décrite comme un facteur d'épissage alternatif du gène *c-src* joue le rôle de compétiteur de HuR dans la liaison d'ARNm contenant des séquences ARE (Linker K, 2005). Du fait des rôles opposés de ces deux facteurs et du fait de la liaison mutuellement exclusives sur ces ARNm, le devenir des ARNm cibles dépend largement du ratio de ces deux protéines dans la cellule (Linker K, 2005). Comme HuR, la protéine KSRP va tenir une importance particulière dans la myogenèse puisque cette protéine va également réguler la demi-vie de la myogénine, de MyoD et de p21 (Briata P, 2005). Dans les myoblastes en prolifération, KSRP va se lier aux séquences ARE de ces transcrits et va induire leur dégradation grâce au recrutement de l'exosome. Mais au cours de la différenciation, KSRP, comme c'est le cas pour Pitx2, va être modifiée post-

traductionnellement . En effet, la phosphorylation de KSRP par p38 va diminuer l'affinité de liaison de KSRP aux transcrits myogéniques et donc va atténuer leur dégradation (BriataP, 2005). De manière coordonnée, on observe dans les myoblastes en différenciation une accumulation du niveau cytoplasmique de HuR qui va favoriser la stabilisation des transcrit MyoD, myogénine et p21 (Von Roretz C, 2011) (BriataP, 2005). Ces deux types de régulation par KSRP et HuR permettent de contrôler la transition entre la prolifération et la différenciation musculaire.

La protéine CUG-BP1

La famille des protéines CELF (CUG-BP1 and ELAV Type RNA binding protein 3/ ETR3-Like Factor) est une autre famille de RBP liant les séquences ARE. Cette famille a été reliée à la famille ELAV (embryonic lethal abnormal vision) par analyse phylogénétique. Elle est composée de 6 membres dont l'un des membres fondateurs est CUG-BP1 (Barreau C, 2006) (Vlasova IA, 2008). L'expression de CUG-BP1 est répandue dans les tissus adultes : on notera en particulier une forte expression dans le cœur, le cerveau et le muscle. Cette protéine, localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, a une fonction nucléaire de contrôle de l'épissage alternatif de différents pré-ARNm (Vlasova IA, 2008). Sa fonction cytoplasmique quant à elle est associée à une fonction régulatrice de la traduction. La protéine CUG-BP1 peut se lier à la fois à des éléments riches en GC ou en GU ainsi qu'aux séquences ARE et va pouvoir ainsi réguler la stabilité et la traduction de plusieurs facteurs clé de la myogenèse.

Par exemple, CUG-BP1 va se lier à la région riche en GC du facteur MEF2, ce qui va induire une augmentation de la traduction de celui-ci et entraîner un retard dans la mise en place de la différenciation musculaire (Timchenko NA, 2004). Lors de la prolifération, la protéine CUG-BP1 va se lier à l'ARNm de cycline D1 et ainsi induire sa traduction et donc favoriser la prolifération cellulaire (Salisbury E, 2008). Au contraire, lors de la différenciation, (Schoser B, 2010) une augmentation de la traduction de p21 induite par la liaison de CUG-BP1 est observée, ce qui entraîne une sortie du cycle cellulaire (Salisbury E, 2008).

La dystrophie myotonique de type 1 est liée à la protéine CUG-BP1. La dystrophie myotonique est une maladie autosomale dominante qui se manifeste entre autres par le développement de myotonie (trouble du tonus musculaire) mais aussi de cataracte (Miller JW, 2000). Cette maladie est associée soit à une expansion de triplet CUG au niveau de la région

3'UTR du gène *DMPK* (DM de type 1) soit à une expansion de la répétition CCTG au niveau de l'intron 1 du gène *zinc finger 9* (*ZNF9* ; DM type 2) (Wang GS, 2007). Ces gènes transcrits avec de longues répétitions entraînent la formation d'ARNs mutants dits « toxiques ». Le transcrit mutant *DMPK* contenant l'expansion CUG va constituer des complexes stables avec la protéine CUG-BP1 qui dans un contexte physiologique sain ne lie pas l'ARNm *DMPK* (Schoser B, 2010). Cette interaction mène à la stabilisation de la protéine CUG-BP1, ce qui expliquerait le niveau élevé de cette protéine chez les patients atteints de DM1. Au niveau moléculaire, DM1 est associée à la perte de fonction du facteur d'épissage MBNL1, protéine la plus importante de la famille MBNL dans le muscle squelettique, et à un gain de fonction de la protéine CUG-BP1 (Schoser B, 2010). Les dérégulations de MBNL1 et de CUG-BP1 vont causer des défauts d'épissage des transcrits qui codent la troponine cardiaque T, les canaux chloriques de type 1 spécifiques du muscle, ainsi que le récepteur à l'insuline (Schoser B, 2010). Tous ces défauts pourraient expliquer les symptômes observés dans la DM1, comme la résistance à l'insuline, ainsi que la myotonie.

La protéine PABPN1

La protéine PABPN1 (nuclear polyA binding protein 1) constitue un autre exemple d'une protéine importante dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes au cours de la myogenèse (Apponi LH, 2010). Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, cette protéine se lie directement à la queue polyA des ARNm. PABPN1 appartient au complexe de polyadénylation qui est constitué du facteur CPSF et de la polymérase polyA PAP (pour revue (Lemay JF, 2010)). La liaison de PABPN1 à PAP va induire une augmentation de l'activité polymérase de PAP, et il a été montré que la protéine PABPN1, qui est retrouvée de façon prédominante dans le noyau, fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Lemay JF, 2010). La transfection de siRNA dirigés spécifiquement contre PABPN1 dans les myoblastes engendre une accumulation nucléaire des ARNm polyadénylés. La diminution de l'expression de PABPN1 dans les myoblastes entraîne une diminution à la fois de la prolifération mais aussi de la différenciation des cellules (Apponi LH, 2010).

Bien que PABPN1 présente une expression ubiquitaire, les mutations de cette protéine entraînent l'apparition d'une pathologie tissu-spécifique, la dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP) (Schoser B, 2010). La DMOP est une maladie génétique qui se manifeste après 45 ans par un abaissement de la paupière supérieure (ptosis) et par des troubles de la

digestion. L'origine de cette maladie est la mutation de la région N terminale de la PABPN1 qui a pour conséquence l'expansion de résidus alanines qui passe du nombre de 10 à 12-17. Les raisons pour lesquelles la mutation de PABPN1 est responsable de la DMOP ne sont pas encore connues mais on peut penser que la forme mutée échoue dans ses fonctions export et de stabilisation des ARNs (Schoser B, 2010).

La protéine Lin-28

Comme nous l'avons décrit dans les paragraphes précédents, les RBPs sont impliquées dans les différentes étapes du métabolisme des ARNs notamment dans la régulation de la traduction. La protéine Lin-28 est une petite RBP que l'on retrouve exprimée dans le cytoplasme, associée aux polysomes, aux P-Bodies et aux granules de stress (Balzer E, 2007). Cette protéine Lin-28 est connue pour son rôle dans la génération et le maintien des cellules souches et est considérée comme un marqueur du caractère « souche » des cellules (Rybak A, 2008). Il a été montré que Lin-28 inhibe la maturation du miRNA let-7 qui intervient dans la régulation de la croissance et la différenciation des cellules embryonnaires (Rybak A, 2008). Au cours de la différenciation de la plupart des tissus chez les Mammifères, l'expression de Lin-28 est diminuée sauf dans les tissus du muscle cardiaque et du muscle squelettique (Yang DH, 2003). Notre laboratoire a ainsi observé *in vitro* l'augmentation du niveau d'expression de Lin-28 au cours de la différenciation des myoblastes ainsi qu'*in vivo* au cours de la régénération musculaire (Polesskaya A, 2007). De plus, la sur expression de Lin-28 entraîne une induction plus rapide de la différenciation. Au cours de la différenciation *in vitro*, Lin-28 va se lier à IGF-2 et ce complexe va se lier aux polysomes ce qui a pour conséquence une augmentation dans la traduction d'IGF-2 (Polesskaya A, 2007). Lin-28 apparaît donc comme un facteur impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle grâce à ces propriétés de liaison aux ARNs ce qui va moduler ainsi leur traduction.

C. Les miRNAs

Les RBPs ne sont pas les seuls facteurs qui participent à la régulation post-transcriptionnelle, les miRNAs ont été identifiés aussi comme une nouvelle classe de régulateurs endogènes de l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel dans de

nombreux processus biologiques. Les miRNAs appartiennent à une abondante classe d'ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides qui contrôlent post-transcriptionnellement l'expression des gènes en interférant avec la stabilité et/ou la traduction des ARNs en s'appariant le plus souvent au niveau de la région 3'UTR (pour revue (Bartel, 2004)) (**figure 10**). Ces miRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme de longs précurseurs (pri-miR) et sont maturés par le complexe enzymatique Drosha. Cette maturation va ainsi générer la formation d'un précurseur de miRNA (pré-miRNA). Par la suite dans le cytoplasme, ces pré-miRNAs vont subir une autre maturation par l'endonucléase Dicer qui induira la formation d'un petit ARN double brin (Bartel, 2004). Ce miRNA mature va être chargé dans le *RNA-induced silencing complex* (RISC) qui contient les protéines membres de la famille Argonaute (Ago), et dans lequel le miRNA va induire la répression traductionnelle et/ou l'instabilité et la dégradation des ARNs.

Les miRNAs caractéristiques de la myogenèse

Plusieurs miRNAs spécifiques ou fortement enrichis dans le muscle squelettique ont été identifiés. Les microARNs les mieux étudiés dans le muscle consistent en quatre microRNAs matures qui sont issus de transcrits polycistroniques : miR-1/miR-206 et miR133a/miR-133b (Ge Y, 2011). Ces miRNAs sont fortement induits au cours de la différenciation musculaire. Ils sont exprimés dans les muscles squelettiques et cardiaques sous le contrôle de facteur de transcription myogéniques comme par exemple MyoD et MEF2, et ils régulent des processus fondamentaux pour la myogenèse du muscle squelettique comme la prolifération des myoblastes mais aussi leur différenciation (Ge Y, 2011).

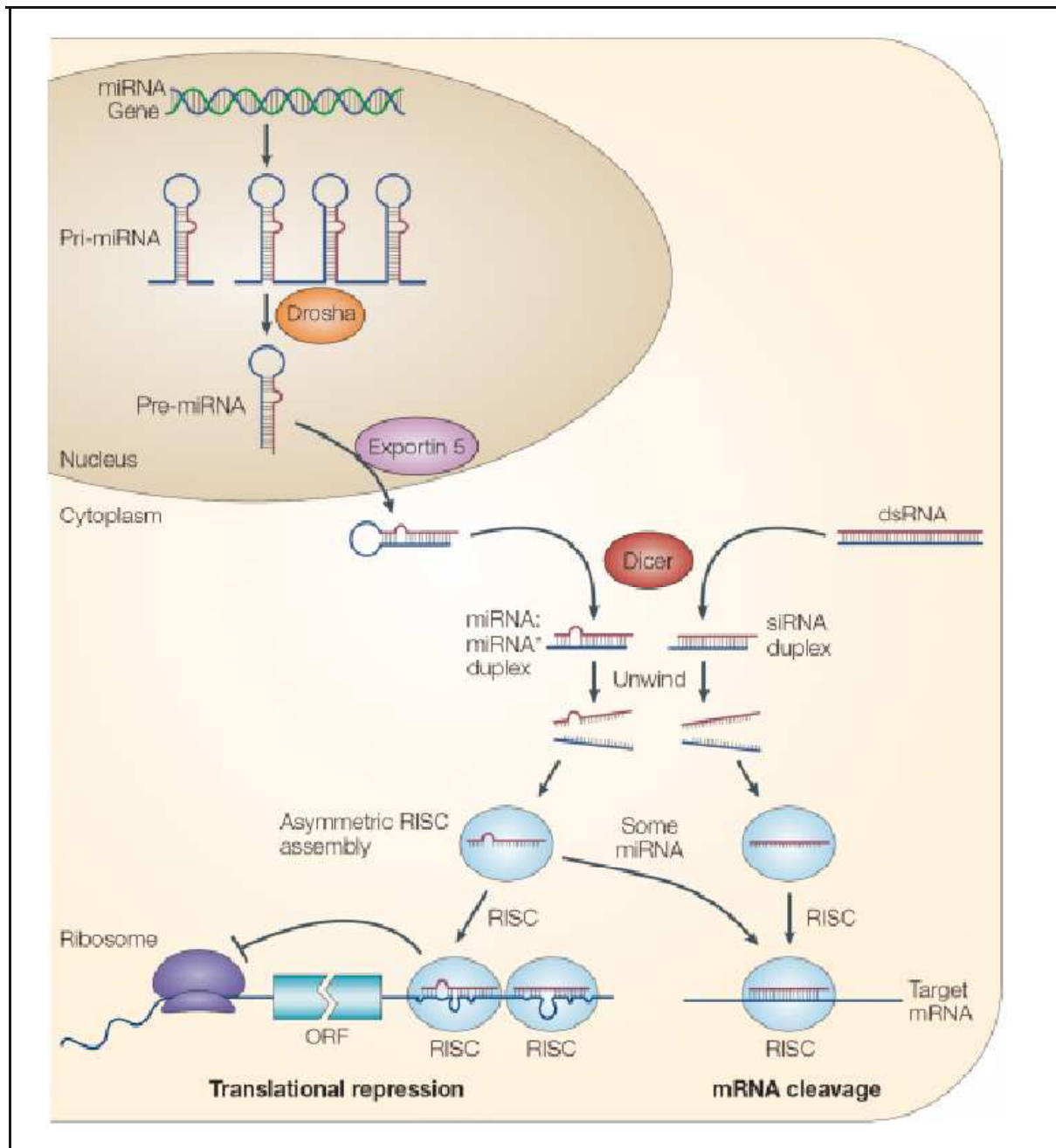


Figure 10. Modèle de la biogenèse et de la régulation de la répression post-transcriptionnelle par les miRNAs et les siRNAs.

À l'intérieur du noyau, les transcrits naissants pri-microRNA sont d'abord maturés par Drosha en des pré-microRNA de 70 nucléotides. Ces pré-miRNA sont transportés vers le cytoplasm par l'Exportine 5 et sont à nouveau maturés en duplexe miRNA :miRNA par Dicer. Seulement un seul brin du duplexe miRNA :miRNA est préférentiellement assemblé dans le complexe RISC qui va ainsi agir sur sa cible en inhibant la traduction ou alors en dégradant l'ARNm. Les siRNA d'origine exogène sont eux pris en charge par RISC et entraînent le clivage et la dégradation de l'ARNm

Figure provenant de He & Hannon, 2004

L'augmentation de l'expression de ces mêmes miRNA est retrouvée lors de l'induction de la différenciation musculaire des myoblastes C2C12 en myotubes (Chen JF, 2006; Kim HK, 2006). Dès lors, cette lignée C2C12 s'est imposée comme un excellent modèle pour étudier les mécanismes fonctionnels et moléculaires des miRNAs dans la régulation de la myogenèse. Il a été montré que dans les C2C12, miR-1 était impliqué dans la répression de l'expression de l'histone deacétylase 4 (HDAC4), un régulateur négatif de la différenciation et un répresseur du facteur de transcription MEF2. La répression de la protéine HDAC4 par miR-1 va constituer ainsi une boucle de rétrocontrôle positive dans laquelle la surexpression de miR-1 par MEF2 va entraîner la répression d'HDAC4 qui va avoir pour conséquence une augmentation de l'activité de MEF2 et ce qui va finalement conduire à la différenciation des myoblastes (Chen JF, 2006).

Comme miR-1, miR-206 a été découvert comme un facteur qui *in vitro* favorise la différenciation des C2C12 (Kim HK, 2006). miR-206 induit la différenciation musculaire en réprimant l'expression de plusieurs de ses cibles comme la connexin 43 ou encore l'utrophine (Anderson C, 2006).

De nouveaux miRNAs régulent la myogenèse

Des miRNAs appartenant à d'autres clusters ont été décrits comme étant associés à la fonction du muscle squelettique. Lors de la différenciation musculaire, le niveau d'expression de miR-24 est très élevé et il a été rapporté que la régulation transcriptionnelle de miR-24 était contrôlée par la voie de signalisation du TGF- β . Des expériences de perte de fonction de miR-24 dans les C2C12 ont révélé une diminution de l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation musculaire comme la myogénine ou encore la myosine à chaînes lourdes. A l'inverse, l'expression ectopique de miR-24 dans les myoblastes C2C12 favorise la différenciation musculaire (Sun Q, 2008). D'autres miRNAs ont été reportés comme ayant un rôle non négligeable dans le développement musculaire, comme miR-181 qui est requis pour la différenciation musculaire via la régulation du gène de la famille des gènes à homéobox, Hox-A11 (Naguibneva I, 2006b).

Chapitre III

La famille des IMPs

I. INTRODUCTION :

L'Insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 2 (IMP-2) appartient à une famille de protéines de liaison à l'ARN (IMP-1, IMP-2 et IMP-3). Ces IMPs sont retrouvées exprimées dans différentes espèces. Ces protéines comme beaucoup de RBPs sont impliquées dans des processus de régulation post-transcriptionnelle comme la localisation, la stabilisation ou encore la traduction de l'ARN qui seront détaillées dans les paragraphes suivants.

A. Nomenclature et découvertes des IMPs

Les protéines de liaison à l'ARN d'*igf-II* (IMPs) portent ce nom en raison de leur capacité à se lier à l'ARN du gène *igf-II* (Nielsen J, 1999). Elles sont également appelées IGF2BP (IGF-II mRNA binding protein), à ne pas confondre avec les protéines IGFBP qui elles ne lient pas l'ARN *igf-II* mais les protéines IGF.

Le groupe de Yisraeli a proposé l'acronyme VICKZ pour homogénéiser l'ensemble des termes utilisés pour décrire les protéines de la famille des IMPs où

- V correspond à la première protéine identifiée qui lie l'ARN *VgI* (Vg1RBP ou Vera), décrite par le groupe d'Yisraeli en 1999
- I désigne les IMPs
- C représente la protéine appelée CRD-BP,
- K la protéine KOC et
- Z la protéine ZBP-1.

Cependant ce terme ne semble pas s'imposer de lui-même dans les publications concernant cette famille de protéines.

L'insulin-like growth factor II (IGF-II) est considéré comme l'un des facteurs déterminants de la croissance fœtale chez la souris, une fonction assurée après la naissance par le facteur de croissance IGF-I. Les souris qui présentent une absence d'IGF-II donnent naissance à une progéniture de petite taille mais elles ne montrent aucune anomalie apparente (DeChaira TM, 1990).

Chez l'Homme, la surexpression d'IGF-II est associée au syndrome Beckwith-Wiedemann qui est caractérisé par une croissance excessive du fœtus et une hypertrophie des organes {Weksberg R, 2003 #312}. L'*igf-II* est un gène dont la régulation est soumise à l'empreinte parentale puisque seul l'allèle paternel est exprimé. L'expression d'*igf-II* peut aussi être régulée au niveau post-transcriptionnelle (DeChaira TM, 1990). En effet, cette régulation post-transcriptionnelle se reflète via la diversité des transcrits issus du gène *igf-II*. Chez l'Homme et la souris, IGF-II est codé par une série de transcrits ARNs primaires qui diffèrent uniquement au niveau de leur région 5'UTR appelées « leader ». Nielsen FC a montré dans une lignée de cellules humaines de rhabdomyosarcomes (RD), l'existence d'un ARN *igf-II* de taille 4,8kb avec un 5'UTR de 100 nucléotides nommé *leader 4* (L4) et un ARN *leader 3* (L3) de taille 6kb qui est traduit dans les cellules en prolifération (Nielsen FC et al, Nature 1995). Il a été montré que l'homologue murin de l'ARN *leader 3 igf-II* passe d'un stade activement traduit à un état réprimé entre les jours de développement embryonnaire 11,5 j (E11.5) et E12.5.

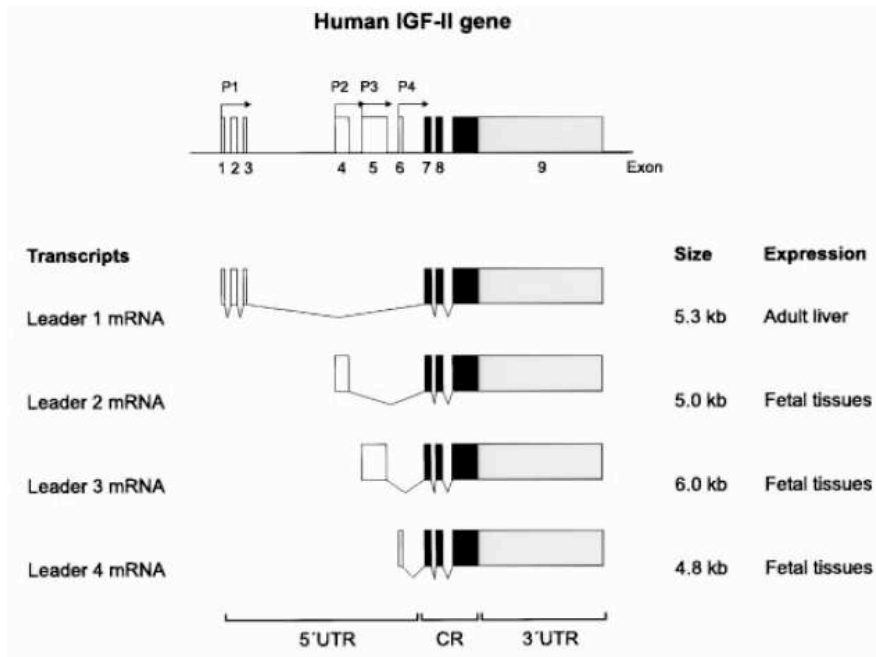


Figure 11 : Représentation schématique du gène *igf-II* chez l'Homme.

Chez l'Homme, le gène *igf-II* comporte neuf exons. Les 180 acides aminés qui composent la protéine IGF-2 sont codés par les exons 7, 8 et par les 234 premiers nucléotides de l'exon 9 (ces exons correspondent aux rectangles noirs). Le gène *igf-II* produit quatre ARNm appelés « leader » 1,2,3 et 4 qui diffèrent par leur régions 5'UTR et qui sont transcrits à partir de quatre promoteurs (P1, P2, P3 et P4). La taille des ARNm et leurs expressions dans les tissus adultes et foetaux sont indiquées à droite.

Figure provenant de Pedersen et al, 2002

B. Structure et séquence des IMPs

Les IMPs varient entre 60-70 kDa. Chacun des membres possède des motifs structuraux qui sont caractéristiques des RBPs. Ils possèdent deux motifs RRM (RRM1 et RMM2) situés au niveau de l'extrémité amino terminale et quatre domaines KH (KH1-4) situés au niveau de l'extrémité carboxy terminale. Ces motifs sont couramment trouvés chez d'autres RBPs comme hnRNPA1 mais la combinaison de deux RRM et de quatre KH est une signature structurale unique aux IMPs (Nielsen J, 1999) (**figure 12 et 13**). Les travaux de Nielsen ont permis de souligner l'importance des quatre domaines KH qui confèrent aux IMPs leur forte affinité de liaisons aux ARNs, leur capacité à modifier la localisation de ces ARNs ainsi que la formation des granules RNPs (Johnson L, 2007). L'importance des domaines RRM n'a pas encore été élucidée. Néanmoins, la comparaison des orthologues des IMPs chez les Vertébrés a montré que la pression de conservation exercée sur les domaines KH est la même que sur les domaines RRM, ce qui laisse suggérer l'importance de ces domaines RRM (pour revue (Yisraeli, 2007)). Ces RRM ne sont toute fois pas retrouvés chez l'unique membre de la famille des IMP chez la drosophile (**figure 12**).

En plus de la pluralité des contacts des IMPs avec les ARNs dus à la présence de domaines KH et RRM, ces interactions sont multipliées par des contacts protéine-protéine grâce à ces mêmes domaines. En ce qui concerne IMP-1, les domaines KH3 et KH4 permettent des hétérodimérisations avec par exemple les protéines HuD (Atlas R, 2004) et PABP (Patel GP, 2006).

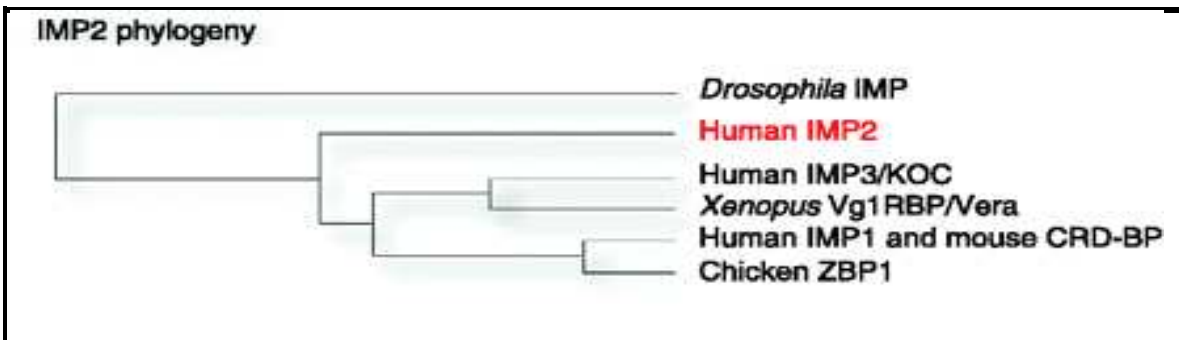


Figure 12. Arbre phylogénétique de la famille des IMPs et des ses orthologues.

IMP1 est presque identique à la protéine CRD-BP et est très proche de ZBP-1 et des orthologues d'IMP3 : KOC et Vg1RBP/Vera. En ce qui concerne IMP2 aucun orthologue n'a été expérimentalement décrit et il représente le membre de la famille le plus éloigné. L'unique membre IMP présent chez la drosophile se distingue par l'absence des deux domaines RRM.

Figure provenant de Christiansen et al, 2009



Figure 13 : Schéma représentant la structure du gène et de la protéine IMP2

Les exons sont représentés sous formes de boîtes grises et les régions 5' et 3' non traduites sont indiquées par la couleur rouge. IMP2 est composée de 16 exons. Chez l'Homme, le gène *imp2* code un variant d'épissage où l'exon 10 est absent, générant ainsi une isoforme d'IMP2 appelé p62. Chez les Mammifères, l'intron 2 est le plus grand et le SNP rs4402960 est reporté comme associé au diabète de type 2.

Figure provenant de Christiansen et al, 2009

II. EXPRESSION SPATIO-TEMPORELLE DES ARNm ET DES PROTÉINES IMPs

L'analyse du profil d'expression des IMPs au cours du développement et dans différents organismes suggère une régulation spatio-temporelle. Lors de leur découverte, les IMPs ont été considérées comme des protéines onco-fœtales puisqu'elles sont à la fois exprimées lors du développement embryonnaire mais aussi exprimées dans des cellules transformées (Nielsen J, 1999). L'expression la plus forte des IMPs est détectée au cours de l'embryogenèse. Par exemple, chez le Xénope en plus de l'expression maternelle de Vg1 RBP/Vera, on retrouve au stade gastrula une expression zygotique au niveau de l'ectoderme (Mueller-Pillasch F, 1999; Yaniv K, 2003; Zhang Q, 1999). Une expression tardive de Vg1 RBP/Vera est également détectée dans les tissus qui dérivent de cette couche comme les crêtes neurales et le système nerveux central. Néanmoins de plus en plus de données s'accumulent concernant l'expression post-natale des IMPs (Mori H, 2001) (Hansen TV, 2004; Wang T, 2003) ce qui laisse suggérer un rôle des IMPs dans les tissus adultes..

Chez les Mammifères, on retrouve également cette expression biphasique des trois IMPs : avec une détection précoce dans les oocytes et dans le zygote qui est suivie par une très forte augmentation de leur expression à la mi-gestation (10,5-12,5 jours) chez la souris (Nielsen J, 1999). A cette période, les IMPs sont exprimées dans la plupart des cellules avec une forte expression notamment dans les cellules épithéliales et neuronales. Les ARNs *imp-1* et *imp-3* sont principalement retrouvés au niveau de la peau, du prosencéphale et du rhombencéphale (Hansen TV, 2004; Mori H, 2001; Mueller-Pillasch F, 1999; Wang W, 2000; Yaniv K, 2003; Zhang Q, 1999). Dans l'embryon, IMP-1 est fortement exprimée dans le cerveau, et détectée dans d'autres tissus comme le thymus, les poumons et les intestins. Chez les Mammifères, à la fin de l'embryogenèse, l'ARN *imp-3* a pratiquement disparu alors que celui d'IMP-1 est détecté dans les testicules, le foie et les reins. Un profil d'expression similaire est aussi retrouvé chez la Drosophile, le Xénope et le poisson-zébre (Adolph SK, 2009).

Au cours de l'embryogenèse chez les Vertébrés, l'expression d'IMP-2 ressemble à celle d'IMP-1 et d'IMP-3 (Hammer NA, 2005). À 17,5 jours, l'expression d'IMP-2 reste importante au niveau du cerveau, des intestins, des poumons, des reins et du foie. De plus, l'expression d'IMP-2 est détectée dans d'autres organes à la fois en période périnatale mais aussi dans des tissus adultes comme l'estomac, le cerveau, la moelle osseuse, le foie, les

poumons, le muscle, les testicules, les reins chez l'Homme et la souris (Gu L, 2004; Hammer NA, 2005).

Plusieurs données suggèrent l'existence de modifications de l'activité des IMP liée à des modifications post-traductionnelles : il a été récemment montré que dans le cas d'IMP-2, sa double phosphorylation au niveau des sérines (en position 162 et 164) par la kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) favorise la traduction de l'ARNm *leader 3 d'igf-II* (Dai N, 2011). Faire une conclusion sur MPT et IMP

On connaît encore peu de choses sur la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de l'expression des IMPs. Toutefois l'étude de souris invalidées pour le facteur de transcription HMGA2 (High Mobility Group A2) présentent une dérégulation négative d'IMP-2 mais pas d'IMP-1, ni d'IMP-3 (Brants JR, 2004), ce qui suggèrent qu'elles sont régulées de manière différente. La protéine HMGA2 est un membre de la famille HMGA qui joue un rôle primordial dans l'organisation de l'assemblage et de la stabilisation de complexes transcriptionnels nucléo-protéiques au niveau des régions promotrices. La localisation subcellulaire des IMPs semble être intimement liée à leur fonction au sein de la cellule. Les localisations d'IMP-1, ZBP-1, Vg1-RBP et d'IMP dans des particules mobiles le long du cytosquelette ont été mis en évidence, laissant supposer un rôle de relocalisation de leur ARN partenaire. Le groupe de Singer a montré que ZBP-1 se localisait au niveau de particules mobiles dans les fibroblastes d'embryons de poulet (Timchenko LT, 1996) et aussi dans les axones et les dendrites de cellules en culture (Tiruchinapalli DM, 2003). Dans les fibroblastes, ces particules sont dépendantes des filaments d'actine alors que dans les axones, elles co-localisent avec les microtubules. Ces particules présentent dans les axones et les dendrites des mouvements antérogrades. Les particules Vg1-RBP affichent à la fois des mouvements uni et bi-directionnels sur le cytosquelette d'actine (Leung KM, 2006). Dans des oocytes de drosophile l'existence de la motilité des particules d'IMP des cellules nourricières aux oocytes a été mise en évidence (Boylan KL, 2008). Ce transport est à la fois dépendant des microtubules et du moteur moléculaire la dynéine. En conclusion, il reste encore des imprécisions sur le fait que les particules IMPs soient transportées via les microtubules ou les microfilaments mais il semblerait que ces transports varient en fonction des espèces et des tissus.

III. RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES IMPs

Afin de déterminer le rôle physiologique des IMPs, des expériences de perte et de gain de fonction ont été menées.

A. Expériences de gain de fonction des IMPs

Par transgénèse chez la souris, la sur-expression de la protéine KOC (l'orthologue d'IMP-3) sous le contrôle du promoteur du gène de la métallothionine qui est exprimé dans l'estomac, le pancréas, le foie et le rein, n'engendre aucune altération macroscopique visible et les souris ont une croissance et un comportement comparables à ceux observés chez les souris contrôles (Wagner M, 2003). Cependant de subtils changements sont observés au niveau de la micro-architecture du pancréas. La sur-expression de CRD-BP (orthologue d'IMP-1) sous la dépendance d'un promoteur spécifique des glandes mammaires (MMTV) entraîne une augmentation de la fréquence de tumeurs mammaires, ce qui laisse supposer un rôle potentiel de CRD-BP/IMP-1 dans le cancer (Tessier CR, 2004). Cependant les mécanismes moléculaires par lesquels les tumeurs se forment restent encore inconnus. Actuellement, aucune donnée de la littérature ne décrit d'expériences concernant la sur-expression d'IMP-2.

B. Expériences de perte de fonction des IMPs

Chez le Xénope où il n'existe qu'un homologue des IMPs, l'inactivation de l'expression de Vg1 RBP/Vera par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (appelés morpholinos) entraîne une absence de pigmentation latérale et ventrale des embryons, une altération ou une absence de la nageoire dorsale, la non fermeture du tube neural et des malformations de la tête (Yaniv K, 2003). Ce phénotype est lié en partie à l'absence de migration de deux populations de cellules provenant du tube neural et de la crête neurale. Dans les deux cas, les cellules expriment les marqueurs de différenciation attendus, mais leur migration est bloquée et ces cellules n'atteignent pas leur localisation définitive. Lorsqu'on injecte un ARN *Vg1*

RBP/Vera sens insensible aux morpholinos, on restaure un phénotype normal dans 88% des cas montrant que Vg1 *RBP/Vera* joue un rôle primordial dans la migration des cellules au cours de l'embryogenèse (Yaniv K, 2003).

Dans les neurones de rat, la formation des filopodes dendritiques nécessite une polymérisation localisée de la protéine β -actine ainsi qu'une localisation précise et correcte de son ARNm (Tiruchinapalli DM, 2003). La dépolarisation des neurones par du chlorure de potassium (KCl) va entraîner une augmentation de ZBP1 au niveau des dendrites (Tiruchinapalli DM, 2003). Cette augmentation n'est pas due à une expression accrue de ZBP1 mais est due à l'augmentation du transport de ZBP-1 du corps cellulaire des neurones à leurs dendrites. Par un mécanisme non encore identifié, cette dépolarisation va stimuler l'association entre ZBP1 et l'ARNm de la β -actine dans les dendrites qui va agir sur la morphologie des dendrites et la longueur des synapses (Eom T, 2003). Cette observation conforte les données obtenues chez la Drosophile. Afin d'identifier les protéines mobiles lors de l'ovogenèse, un crible basé sur des protéines étiquetées par la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) à été réalisé {Morin X, 2001 #311} et dIMP a été identifiée parmi ces protéines. Les larves de drosophiles dont les allèles du gène codant dIMP sont mutés (homozygotie ou hétérozygotie) présentent des défauts de transmissions synaptiques (Boylan KL, 2008). L'augmentation de la densité de filopodes dendritiques et du nombre de synapses a été décrite dans des cellules qui sur-exprimaient la séquence zipcode contenue dans l'ARNm de la β -actine. En effet, cette séquence est à la fois importante pour la liaison de la protéine ZBP1 et pour la localisation intracellulaire de l'ARNm de la β -actine ; la surexpression de cette séquence permet à la fois de recruter la protéine endogène ZBP1 et l'ARNm de la β -actine au niveau des dendrites des neurones de rats (Eom T, 2003). De plus, il a récemment été mis en évidence que dans les neurones d'embryons de souris déficientes en ZBP1 (Hansen TV, 2004), on observe un défaut dans l'enrichissement de la β -actine au niveau des cônes de croissance. En effet, ZBP1 est requis pour la stimulation de la traduction de la β -actine dans le cône de croissance des axones (Welshhans K, 2011). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle majeur de ZBP1 dans la formation de filopodes dendritiques synaptiques via son habilité à transporter l'ARNm de la β -actine et à faciliter sa traduction au niveau des filopodes.

D'autres expériences mettent en évidence de nouvelles fonctions des IMPs, comme par exemple la régulation de la prolifération. CRD-BP a été initialement clonée sur la base de sa capacité à stabiliser l'ARNm de *c-myc* (Eom T, 2003). L'inhibition de son expression par

l'utilisation de siARNs dans des cellules leucémiques K562 humaines résulte en une augmentation de la prolifération cellulaire (Zhang Q, 1999). Cependant, ces cellules ne présentent pas de diminution significative dans l'expression de *c-myc* ni au niveau de l'ARNm ni au niveau protéique suggérant le recours à un autre mécanisme. La surexpression d'IMP-1 dans ces mêmes cellules entraîne en revanche la répression de la traduction de l'ARNm d'*igf-II* alors que sa répression a pour conséquence une augmentation d'un facteur quatre de l'expression de la protéine IGF-II. L'utilisation d'anticorps qui bloque l'action d'IGF-II montre que c'est l'augmentation de la protéine d'IGF-II qui est responsable de l'augmentation de la prolifération (Liao B, 2004).

Une perte de fonction de CRD-BP/IMP-1 a été également réalisée *in vivo* grâce à des souris invalidées pour ce gène par la méthode de « gene trap » qui a permis la sélection d'un allèle *imp1* où la cassette contenant les gènes *β -galactosidase* et *neomycine* s'était intégrée au niveau de l'intron 2 (Hansen TV, 2004). Cette insertion mène à l'expression d'une protéine de fusion IMP-1- *β -galactosidase-neomycine* qui possède le premier domaine RRM codé par les exons 1 et 2 mais ne contient plus le domaine des RRM2 et les quatre domaines KH (Hansen TV, 2004). Ces mêmes souris *imp1*^{-/-} sont en moyenne 40% plus petites que les souris sauvages. Un nanisme résultant d'un retard de développement (hypoplasie) apparaît au 17^{ème} jour de la gestation. De plus, on observe une forte mortalité périnatale puisque seulement 50% d'entre elles survivent trois jours après la naissance (Hansen TV, 2004). On observe aussi un développement imparfait de l'intestin avec de petites villosités intestinales et des cryptes de formes anormales. Ces données soulignent l'importance d'IMP-1 dans le développement embryonnaire dans un contexte physiologique normal ainsi que son rôle dans la survie périnatale (Hansen TV, 2004). On remarque que l'invalidation (*knock-out* ou (KO)) chez la souris d' *igf-II* (DeChaira TM, 1990; Liu JP, 1993), *c-myc* ou encore *hmga2* (Brants JR, 2004) « phénocopie » le nanisme observé dans les souris KO IMP-1.

Une autre fonction associée aux IMPs est leur rôle dans l'adhésion cellulaire et la formation d'invadopodes. Les invadopodes sont des structures observées à la surface de certaines cellules épithéliales et qui prennent la forme d'invagination. Ces structures semblent être associées aux processus invasifs des cellules tumorales, et plus précisément impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire et des membranes basales. L'absence d'IMP-1 ou d'IMP-3 dans des cellules HeLa affecte à la fois les processus d'adhésion cellulaire et de formation d'invadopodes via l'inhibition d'ARNm qui codent des protéines impliquées dans ces phénomènes comme CD44 (Vikesaa J, 2006). De plus, l'absence d'IMP-1 et d'IMP-3

diminue aussi l'expression d'ARNm qui codent des protéines impliquées dans la composition de la matrice extracellulaire (Vikesaa J, 2006). Ces résultats obtenus dans un contexte *in vitro* concordent avec ceux qui sont obtenus *in vivo* dans les souris *imp-1* KO (Hansen TV, 2004). L'ensemble de ces expériences permet d'affirmer qu'en plus de leur rôle dans la régulation du transport intracellulaire de l'ARN et de leur implication dans la régulation de la motilité via la formation des lamellipodes et des filopodes, les IMPs sont également importantes dans la régulation de la prolifération cellulaire.

IV. IMPLICATIONS DES IMPs DANS LES PATHOLOGIES.

A. Le cancer

De nombreuses études ont montré la surexpression des IMPs dans différents cancers ou alors associée à d'autres pathologies (Chen ST, 2011; Liao B, 2005; Mueller-Pillasch F, 1999; Pryor JG, 2008) (**tableau 1**). Les deux premiers membres de la famille des IMPs chez l'Homme ont été clonés sur la base soit de leur sur-expression dans des carcinomes pancréatiques pour le membre IMP-3 (Mueller-Pillasch F, 1997), soit du fait de la production d'anticorps auto-immuns contre la protéine p62 (variant d'IMP-2 qui diffèrent par la présence de 43 acides aminés situés entre les domaines KH2 et KH3, ce variant encore appelé *hepatocellular carcinoma autoantigen* (HCCA) est issu d'un épissage alternatif du pré-ARNm) ou dans des carcinomes hépatocellulaires {Zhang JY, 1999 #310}.

Plus récemment, l'analyse par microarray du transcriptome de carcinomes ovariens ou pulmonaires a révélé la sur-expression de hIMP-3 par rapport à des tissus sains où son expression est presque indétectable (Wang T, 2003). Du fait de leur surexpression dans plusieurs types de cancers, il a été proposé que les IMPs soient des marqueurs pertinents des cancers des ovaires (Gu L, 2004) et qu'IMP-3 soit un marqueur du caractère malin des tumeurs. La production d'auto-anticorps contre les IMPs pourrait être utilisée comme potentiel diagnostique. Un des défis dans les prochaines années est de comprendre de quelle(s) manière(s) les IMPs sont connectées aux différents types de cancers. Étant donné les fonctions connues des IMPs dans un contexte physiologique sain, l'hypothèse selon laquelle la sur-expression des IMPs dans différents cancers pourrait être responsable de la croissance aberrante des cellules, de l'augmentation de la migration et du caractère métastatique est séduisante et quelques résultats expérimentaux viennent l'étayer. En effet, la comparaison du transcriptome d'une lignée d'adénocarcinome métastatique MTLn3 et d'une lignée non-

métastatique MTC, qui proviennent de la même tumeur primaire de rat, a montré une fluctuation dans l'expression de gènes impliqués dans la motilité cellulaire (Wang T, 2003). Parmi ces gènes, on retrouve ZBP-1 dont l'expression est diminuée dans les cellules MTLn3 par rapport aux cellules MTC. Il a également été montré que la lignée métastatique ne présente ni localisation périphérique de l'ARNm de la *β -actine* ni polarisation cellulaire de cet ARNm alors qu'on l'observe dans l'autre lignée (Lapidus K, 2007). Les auteurs ont proposé un modèle dans lequel ZBP-1 conférerait une polarité intrinsèque aux cellules et faciliterait ainsi leur mobilité (Lapidus K, 2007). Il reste encore de nombreuses zones d'ombres quant au(x) lien(s) supposé(s) entre la potentialité des caractères métastatiques des différentes tumeurs et le niveau d'expression des IMPs. Mais avec leur faible ou non détectable expression dans les tissus adultes sains, la famille des IMPs pourrait devenir une cible très attrayante pour empêcher ou contrôler la formation de métastases.

| Type de tumeurs | VICKZ protéine | ISE | Références |
|---------------------------|----------------|---------------|-------------------------------|
| Carcinome pancréatique | hVICKZ3 | 33,3% (5/15) | (Mueller-Pillash et al, 1997) |
| | hVICKZ3 | (79% (15/19) | (Yantiss et al, 2005) |
| Carcinome colorectal | hVICKZ1 | 81% (17/21) | (Ross et al, 2001) |
| Cancer du foie | hVICKZ2(p62) | 34,5% (10/29) | (Lu et al, 2001) |
| Tumeurs du cerveau | hVICKZ1 | 54,9%(28/51) | (Ioannidis et al, 2004) |
| Carcinome pulmonaire | hVICKZ1 | 26,7%(4/11) | (Ioannidis et al, 2004) |
| Tumeurs mésoenchymateuses | hVICKZ1 | 65,1% (28/43) | (Ioannidis et al, 2001) |
| Adénocarcinomes | hVICKZ3 | 87% (73/84) | (Vainer G et al, 2008) |

Tableau 1. Incidence de la surexpression (ISE) des protéines VICKZ dans différents types de cancers.

Ce tableau comporte des données qui proviennent de plusieurs articles traitant de la surexpression des protéines VICKZ chez les patients atteints de différents types de cancer. La présence d'anticorps auto-immuns VICKZ décrite dans plusieurs articles (Zhang et al, 2001, 2003 ; Koziol et al., 2003) suggère que ces protéines VICKZ sont surexprimées. La détection de ces sur-expressions a été mesurée par qRT-PCR et/ou Western Blot.

Tableau adapté de Yisraeli, 2005

B. Le diabète de type 2 (DT2)

Récemment, une autre pathologie a été associée aux IMPs : le diabète de type 2 (DT2). Des études du génome de patients atteints de DT2 ont mis en évidence le polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (Single-Nucleotide Polymorphism ou SNP) présent dans l'intron 2 d'IMP-2. Le variant est associé à une augmentation modérée du risque de développer un DT2 (Scott LJ, 2007). Pour le moment, cet intron 2 de 125 paires de bases (bp) n'est pas connu pour affecter l'épissage des variants d'IMP-2 (comme p62) ou encore déréguler l'expression du gène *imp-2*. Cependant, les SNP sont pourraient affecter la fixation d'autres régulateurs tels que des microRNAs, d'anti-sens de l'ARN ou encore de longs ARNs non-codants qui pourraient s'apparier à l'intron 2 du gène *imp-2*. Ces hypothèses pourraient ainsi apporter des explications quant aux mécanismes moléculaires qui relie IMP-2 au DT2. Outre les SNP, les variations d'expression d'IMP-2 et/ou la régulation de sa double phosphorylation par mTOR pourrait contribuer chez l'adulte à la susceptibilité au DT2 (Dai N, 2011).

V. FONCTIONS CELLULAIRES ASSOCIÉES AUX IMPs

Bien que localisées dans le noyaux, les IMPs résident principalement dans le cytoplasme (Nielsen J, 1999) où elles sont largement présentes dans des granules RBP mobiles (100-300nm) (Johnson L, 2007).

A. Fonctions nucléaires des IMPs

La présence de deux séquences d'export nucléaire (Nuclear Export Signal ou NES) suggère que les IMPs jouent un rôle dans le noyau en contrôlant la maturation de ces ARNs cibles ainsi que dans leur export. Ces deux signaux d'export nucléaire ont été identifiés dans les domaines KH2 et KH4. L'expression transitoire du transgène *imp-1 gfp* dans des fibroblastes murins NIH 3T3 a montré une accumulation de la protéine de fusion dans le noyau sans compartimentalisation particulière (Nielsen J, 2003). Les NES sont suffisants pour induire une concentration de la protéine de fusion IMP-1 GFP nucléaire dans 80-90% des cellules transfectées (Nielsen J, 2003). Seul le NES contenu dans le motif KH4 de l'homologue d'IMP-1 chez la *Drosophile* est conservé (Nielsen J, 2000).

L'hypothèse selon laquelle les protéines IMP pourrait avoir une fonction dans le noyau est renforcée par la détection de la présence d'IMP-3 dans le complexe d'épissage appelé « spliceosome » dans les cellules HeLa (Doyle GA, 1998; Zhou Z, 2002). L'analyse de la protéine IMP-1 chez la souris et le poulet montre que les acides aminés situés entre les domaines RRM1 et RRM 2 et les domaines RRM2 et KH1 contiennent un signal potentiel de localisation nucléaire (Nuclear Localisation Signal ou NLS) (Doyle GA, 1998) (Zhou Z, 2002). Cependant, aucune de ces séquences ne présente d'activité d'import nucléaire ce qui laisse présager l'implication de partenaires protéiques des IMPs qui seraient impliqués dans la leur translocation dans le noyau (Nielsen J, 2000). L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse selon laquelle IMP-1 et/ou la famille des IMPs dans son ensemble se lieraient avec des ARN dans le noyau et interviendraient ainsi dans le devenir cytoplasmique de ces ARN.

B. Fonctions cytoplasmiques des IMPs

Dans le cytoplasme, les IMPs se trouvent dans de larges granules dispersés autour du noyau mais aussi dans des protrusions comme dans le cas des cellules humaines dérivées de cancers du sein. Ces granules se déplacent le long des microtubules (MTs) à une vitesse de 0,2 $\mu\text{m/s}$ et lors de la migration des cellules, ces granules passent d'une répartition aléatoire dans le cytoplasme à une répartition localisée au niveau du front de migration des cellules (Nielsen FC, 2002). Ces granules dans les cellules neuronales sont localisés au niveau des dendrites et des cônes de croissance (Deshler JO, 1998; Tiruchinapalli DM, 2003) et on les retrouve également au niveau du pôle végétatif des oocytes de Xénope (Deshler JO, 1998) (Havin L, 1998).

Dans le cas d'IMP-1, les granules représentent des entités uniques distinctes d'autres granules trouvés dans la cellule, comme les granules neuronales *staufen*, les granules FRMP, les Processing Bodies (P-Bodies) ou les granules de stress (Johnson L, 2007). En effet, ces granules IMP-1 se distinguent des autres granules par leur apparence microscopique et leur contenu protéique. Les granules IMPs ont un diamètre d'environ 100-300nm et contiennent la petite sous-unité ribosomique 40S, des RNPs dont des protéines qui lient les queues poly(A) ainsi que des ARNs. On y trouve également des protéines des complexes de jonctions d'exons ainsi que le facteur CBP80 (protéine de liaison à la coiffe des ARNm) (Izaurralde, 2002). L'absence de facteur d'initiation de la traduction comme eIF4E ou eIF4G et de la grande sous-unité ribosomique 60S indique que les ARNm présents dans les granules IMPs sont dans

un état traductionnel inactif (Johnson L, 2007). Afin d'identifier les ARNm présents dans les granules IMP-1, Johnson et ses collègues ont isolé les ARNm qui ont ensuite été analysés à l'aide de puces de type Affymetrix®. Dans le cas des granules IMP-1, certains des ARNs identifiés codent des protéines impliquées dans la dégradation des protéines dépendantes de l'ubiquitination (les protéines E3 ubiquitine ligase de la famille des RING Finger (RNF4, RNF26, RNF130...)), ou dans le contrôle-qualité telle que la mannosidase β , ainsi que la sécrétion des protéines telle que les sous-unités α et β du protéasome (Johnson L, 2007). La nature de ces ARNs propose le concept de granules IMP-1 comme entité comparable à un opéron post-transcriptionnel (Keene JD, 2002).

Les cibles ARNs des IMPs contiennent plusieurs sites de liaison aux IMPs, le plus fréquemment situés dans les régions UTR mais également dans leurs régions codantes. Les IMPs qui lient ces ARNm cibles vont être impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de ces ARNm cibles (**tableau 3**).

Les IMPs ont une importance également dans le transport des ARNs tels que l'ARN H19 et l'ARNm tau (Atlas R, 2004) (Runge S, 2000). En effet, la localisation de l'ARN est importante par exemple lors de l'établissement de polarité de la cellule comme lors de la migration des cellules. L'une des caractéristiques les plus importantes derrière ce mécanisme de polarité cellulaire est la capacité de la cellule à contrôler le transport intracellulaire des ARNs, afin que ceux-ci ne soient pas traduits avant d'être arrivés à destination, et en absence d'un signal donné.

Les IMPs interviennent comme nous l'avons vu dans la régulation de la traduction mais aussi de la stabilité des ARNm. Récemment, il a été montré que la co-expression d'IMP-1 et de l'ARN *igf-II leader 3* montre que la protéine IMP-1 est impliquée dans le contrôle de la traduction de ce transcrit (Nielsen J, 1999) (Nielsen FC, 1995).

| Organismes | VICKZ protéines | Fonctions associées aux ARNs | Références |
|------------|-----------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Homme | hVICKZ3 | Epissage | (Zhou et al,2002;Doyle et al,1998) |
| | hVICKZ | Traduction | (Nielsen et al, 1999) |
| | hVICKZ | Transport | (Atlas et al,2004; Runge et al, 2000) |
| Souris | mVICKZ1 | Stabilisation | (Doyle et al, 1998) |
| Poulet | cVICKZ1 | Stabilisation | (Vainer et al,2008) |
| Xénope | xVICKZ3 | Localisation | (Deschler,1998) |

Tableau 2. Exemples de fonctions des protéines VICKZ associées aux ARNs

Chez la souris, CRD-BP/IMP-1 a été décrit comme facteur stabilisateur du transcrit *c-myc*. CRD-BP se lie à une séquence de 250 nucléotides située sur l'extrémité 3' de la région codante de *c-myc* empêchant ainsi l'accès d'endonucléases (Doyle GA, 1998) {Lee, 2006 #308} {Noubissi FK, 2006 #307}. IMP-1 et IMP-3 sont aussi impliquées dans la prolongation de la demi-vie de l'ARN *CD44* (Vikesaa J, 2006). En effet, des expériences de quantification de transcrits *CD44* en présence d'actinomycine D (un inhibiteur de la transcription) et en absence d'IMP-1 ou d'IMP-3 dans les cellules de cancer du col utérin HeLa ont montré une forte diminution de la stabilité de l'ARN *CD44* dans ces cellules (Vikesaa J, 2006). Cet ARNm qui présente cinq sites de liaison aux IMPs dans sa région 3'UTR est essentiel pour la formation d'invadopodes grâce à la stabilisation de stabilité de l'ARN *CD44* (Vikesaa J, 2006).

VI. LES PARTENAIRES ASSOCIÉS AUX IMPs

A. Les ARNs associés aux IMPs

La famille des protéines IMPs est impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation de l'ARN comme le contrôle de la traduction de la localisation ou encore de la stabilité de l'ARN. La majorité des ARNs cibles des IMPs a été identifiée par des expériences d'immunoprécipitation après liaison covalente entre ARN et IMP par des Ultraviolets (UV crosslinking) (Hafner M, 2010). Les résultats ont été confirmés par des expériences de retard sur gel (**tableau 3**). En considérant le fort degré de conservation des protéines IMPs surtout au niveau des RBDs, il est encore difficile de comprendre comment les isoformes au sein d'une même espèce ou les orthologues de différentes espèces peuvent présenter des affinités différentes ainsi qu'une grande diversité dans leurs cibles ARNs (Yisraeli, 2007). Bien qu'une petite région « canonique » de liaison aux IMPs ait été déterminée par UV crosslinking pour un certains nombre de cibles ARNs dans les années 1990 (Deshler JO, 1998; Havin L, 1998; Ross AF, 1997), l'ensemble du répertoire des sites reconnus par les IMPs n'est pas encore bien défini. Cependant des données plus récentes remettent en question cette séquence consensus et proposent des séquences de différentes tailles (Chao Jeffrey, 2010; Hafner M, 2010; Johnson L, 2007). La structure secondaire semble jouer un rôle important dans la reconnaissance avec une protéine IMP particulière. Actuellement, aucun logiciel ne permet d'identifier de nouvelles cibles potentielles des IMPs sur la base de leurs seules séquences nucléotidiques. Néanmoins d'autres cibles ARNs continuent à être identifiées grâce à l'analyse du transcriptome par puces « microarray » ou par UV

Crosslinking. Le fait que des protéines si conservées et avec un potentiel de régulation à différents niveaux puissent reconnaître un grand nombre de cibles ARN soulève également la possibilité que la liaison des IMPs à un ARN dépende de l'environnement cellulaire ainsi que des partenaires protéiques des IMPs.

| Organismes | Cibles ARNs | intéragissant avec | Références |
|------------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| Xénope | Vg1 | Vg1 RBP/Vera | (Schwartz et al,1992) |
| | | | (Deshler et al,1998) |
| | | | (Havin et al,1998) |
| | | | (Klausner,2002) |
| | | | (Schwartz et al,1992) |
| | | | (Bubunencko et al,2002) |
| | | | (Claussen et al, 2004) |
| | | | (Claussen et al, 2004) |
| | | | (Elisha et al,1998) |
| | | | (Elisha et al,1998) |
| Rat | tau | Vg1 RBP/Vera | (lithman et al,1996) |
| Poulet | β -actine | ZBP-1 | (Ross et al, 1997) |
| Drosophile | oskar | Vg1 RBP/Vera | (Elisha et al, 1998) |
| | bicoid | Vg1 RBP/Vera | (Elisha et al, 1998) |
| | nanos | Vg1 RBP/Vera | (Elisha et al, 1998) |
| | gurken | Vg1 RBP/Vera | (Elisha et al, 1998) |
| Souris | c-myc | CRD-BP | (Doyle et al, 1998) |
| | H19 | IMP1 | (Runge et al, 2000) |
| | igf2 | IMP1,-2,-3 | (Nielsen et al, 1999) |
| | FRM1 | IMP1 | (Rackham et al, 2004) |
| | Semaphorin 3F | IMP1 | (Rackham et al, 2004) |
| | murf-3 | IMP2 | (Boudoukha et al, 2010) |
| | pinch-2 | IMP2 | (Boudoukha et al, 2010) |
| Souris | murf-3 | IMP2 | (Boudoukha et al, 2010) |
| | pinch-2 | IMP2 | (Boudoukha et al, 2010) |

Tableau 3. Exemples de cibles ARNs des protéines VICKZ

Tableau provenant des données réactualisées de Yisraeli, 2005,

B. Les protéines associées aux IMPs

De nombreuses protéines interagissant avec les IMPs ont été caractérisées (Johnson L, 2007). Dans certains cas, les protéines partenaires ont été immunoprécipitées avec les IMPs à partir d'extraits cellulaires, ce qui indique que ces protéines sont présentes dans les mêmes complexes ARN-protéines bien que celles-ci puissent ne pas interagir de manière directe. Ces interactions peuvent être soit dépendantes de l'ARN, ce qui suggère que le partenaire et les IMPs lient le même ARN; soit ARN indépendante, ce qui indiquerait une interaction directe entre IMP et son partenaire..

L'interaction directe et physique de protéines avec les IMPs a été montrée dans plusieurs modèles par l'utilisation de techniques variées (**tableau 4**). Par exemple chez le Xénope, de nombreux interacteurs de Vg1 ont été décrits (Yisraeli JK, 1990b). La protéine Vg1 RBP/Vera a été isolée sur la base de sa spécificité de liaison avec l'ARNm *Vg1* qui est localisé au niveau du pôle végétatif des oocytes (Yisraeli JK, 1990b). Sur ce même ARNm la protéine hnRNP I est décrite comme partenaire de Vg1 mais cette interaction diffère entre le noyau et le cytoplasme suggérant la possibilité qu'un remodelage ait lieu pendant ou après l'export nucléaire (Kress, 2004). Dans le noyau, l'interaction entre Vg1 RBP/Vera et hnRNP I n'est pas sensible au traitement par la RNase suggérant une indépendance à l'ARN et une interaction directe entre ces protéines. Par contre dans le cytoplasme, ces protéines interagissent entre elles grâce à la liaison d'un même ARN (Kress, 2004). Il a été montré que le complexe ribonucléoprotéique Vg1 (Vg1 RNP) est remodelé lors du transport cytoplasmique de l'ARNm *Vg1* par la protéine hnRNP I qui va permettre l'interaction entre Vg1 RBP/Vera et l'ARNm *Vg1* (Lewis RA, 2008).

Chez l'Homme aussi, les IMPs constituent des complexes RNP composés de multiples interactions ARN-protéine et protéine-protéine. Par exemple, la protéine HuD qui reconnaît les séquences AU-riches, et la protéine G3BP-1, ont été retrouvées dans le complexe IMP-1 dans des cellules P19 et cette interaction semble être ARN dépendante (Atlas R, 2007). Une autre protéine RBP qui reconnaît les régions AU-riche, AUF-1, a été retrouvée comme interacteur direct d'IMP-2 par un crible double hybride (Moraes KC, 2003).

La multitude de protéines qui lient cet ARN va déterminer le devenir de celui-ci comme c'est le cas des protéines qui se lient au promoteur d'un gène donné et qui vont moduler le niveau et le lieu d'expression du gène au cours du temps.

Les protéines du cytosquelette associées aux IMPs

D'autres protéines semblent faire le lien entre les IMPs et la polarité cellulaire, ce sont les protéines associées au cytosquelette.

Dans les oocytes de Xénope, la protéine Vg1 RBP/Vera est trouvée associée avec les MTs (Eilsha Z, 1995). En effet, dans plusieurs cas, il a été prouvé que les MTs jouent un rôle important dans le transport de certains ARNs (pour revue (Gagnon JA, 2011)). Ces résultats confirment les précédentes observations qui montrent que des inhibiteurs des MTs perturbent la localisation de l'ARN *Vg1* dans les étapes de développement des oocytes (Yisraeli JK, 1990a). D'autres structures du cytosquelette sont très importantes pour la localisation correcte de l'ARN. Les microfilaments (MFs) sont nécessaires pour l'ancrage ainsi que le maintien de l'ARN au niveau du pôle végétatif dans les oocytes (Alarcon VB, 2001). D'autres interactions impliquant des structures du cytosquelette et les IMPs ont été découvertes notamment chez le poulet (Ross AF, 1997). Dans les fibroblastes des embryons de poulet, la localisation correcte de l'ARN de la *β -actine* au front de migration des cellules par ZBP1 nécessite des MFs, alors que, dans le cas des neurones, cette localisation requiert des MTs (Bassell G, 1997; Sundell CL, 1991). Néanmoins aucun domaine d'interaction connu avec les MTs ou les MFs n'a été retrouvé dans les protéines de la famille des IMPs, ce qui laisse penser que l'interaction entre les IMPs et les composants du cytosquelette se fait via d'autres protéines présentes dans les complexes RNPs. Par exemple, la protéine Staufén serait une bonne candidate puisqu'elle a été montrée comme associée à Vg1 RBP/Vera de manière ARN indépendante et que les granules Staufén sont transportés dans le cytoplasme via les MTs (Clark I, 1994, Zimyanin VL, 2008).

Une autre protéine qui pourrait faire le lien entre les IMPs et le cytosquelette est la vinculine. Lors d'un crible protéomique qui identifiait les protéines associées aux complexes des centres initiateurs des adhésions focales (AFs), un variant de la protéine IMP-2 chez l'Homme a été découvert, p62 (ou HCCA) (de Hoog CL, 2004). Les AFs sont des structures spécialisées qui permettent l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (MEC) et qui jouent des rôles importants notamment dans la motilité et la morphologie des cellules (pour revue (Sastry S, 2000)) (**figure 14**). Parmi les protéines qui constituent les AFs, on retrouve plusieurs d'entre-elles qui présentent un domaine riche en cystéine appelé LIM. Ce domaine LIM caractéristique des facteurs de transcription et des protéines du cytosquelette et des AFs (Dawid IB, 1995) comme la paxilline et la zyxine et la protéine PINCH-2 (**figure 15**). La protéine PINCH-2 (**P**articularly **I**nteresting **N**ew **C**ystein-**H**istidine-rich protein) est décrite

comme un médiateur du remodelage des AFs et sa surexpression conduit à une diminution de la motilité cellulaire et à un défaut dans l'étalement des cellules (Yang Y, 2008) (cette protéine fera par la suite l'objet de discussion dans le chapitre « Résultats » puisque nous avons montré qu'elle est régulée par IMP-2).

p62 immuno-précipite avec la vinculine dans des cellules attachées à la MEC ou en suspension (de Hoog CL, 2004). Il est intéressant de noter que d'autres protéines qui interagissent avec les IMPs comme FMRP ou qui sont associées à l'ARN comme eEF1- α co-immunoprécipitent aussi avec la vinculine présente au niveau du front de migration des cellules. L'ensemble de ces données peut ainsi aider à mieux comprendre comment les IMPs interagissent avec le cytosquelette et localisent les ARNs dans les cellules polarisées.

| <u>VICKZ homologues</u> | <u>Partenaires protéiques</u> | <u>Références</u> |
|-------------------------|--|--|
| Vg1 RBP/Vera (xVICKZ3) | Vg1 RBP (xVICKZ3) <i>Xenopus</i> Staufen hnRNPI (VgRBP60) Prrp tubulin | (Git et al. , 2002) (Yoon et al. ,2004;Kress et al,2004) (Kress et al. ,2004) (Kress et al. ,2004) (Elisha et al. ,1995) |
| IMP1 (hVICKZ1) | HuD FRMP | (Atlas et al,2004) (Rackham et al, 2004) |
| IMP2 (hVICKZ2) | AUF1 | (Moraes et al,2003) |
| HCC (hVICKZ2) | Vinculin | (de Hoog et al,2004) |

Tableau 4. Partenaires protéiques interagissant avec les protéines VICKZ

Tableau adapté de Yisraeli, 2005

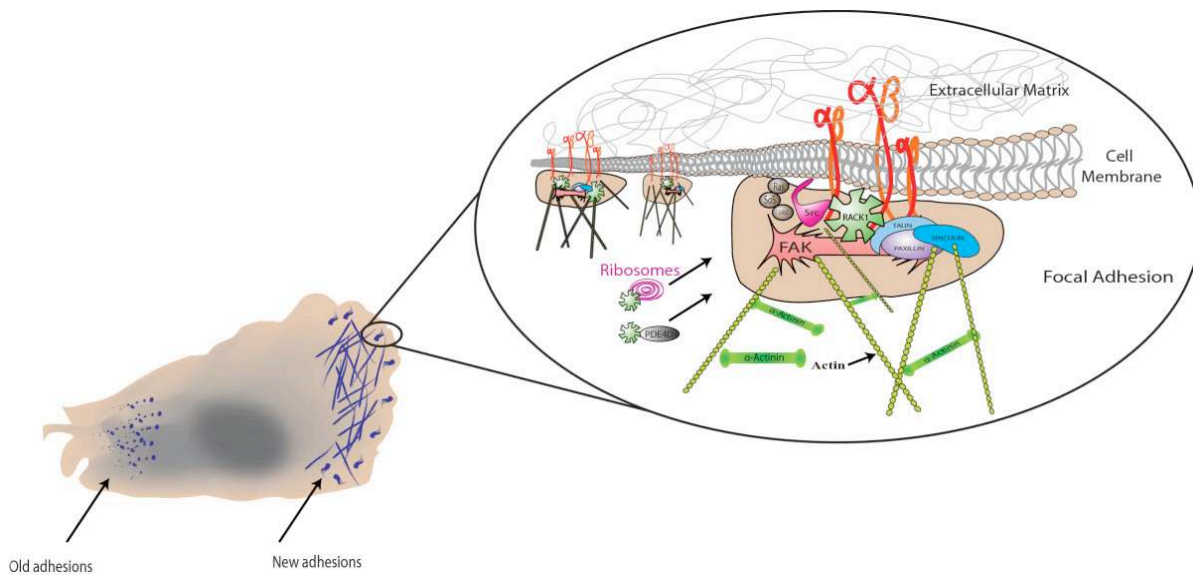


Figure 14 : Représentation schématique des adhésions focales (AFs).

Les adhésions focales sont des structures dynamiques qui s'assemblent et se désassemblent activement dans les cellules qui migrent. Les AFs sont constituées de macrocomplexes protéiques composés notamment de paxiline, vinculine, et d'intégrine (en rouge sur le schéma). Les intégrines lient les composants de la matrice extracellulaire (MEC) comme la fibronectine et le collagène attachant la cellule ainsi à la MEC. Ces intégrines lient aussi le cytosquelette d'actine et cette interaction est stabilisée par d'autres protéines comme la taline et la vinculine.

Figure provenant de (Adams DR, 2011)

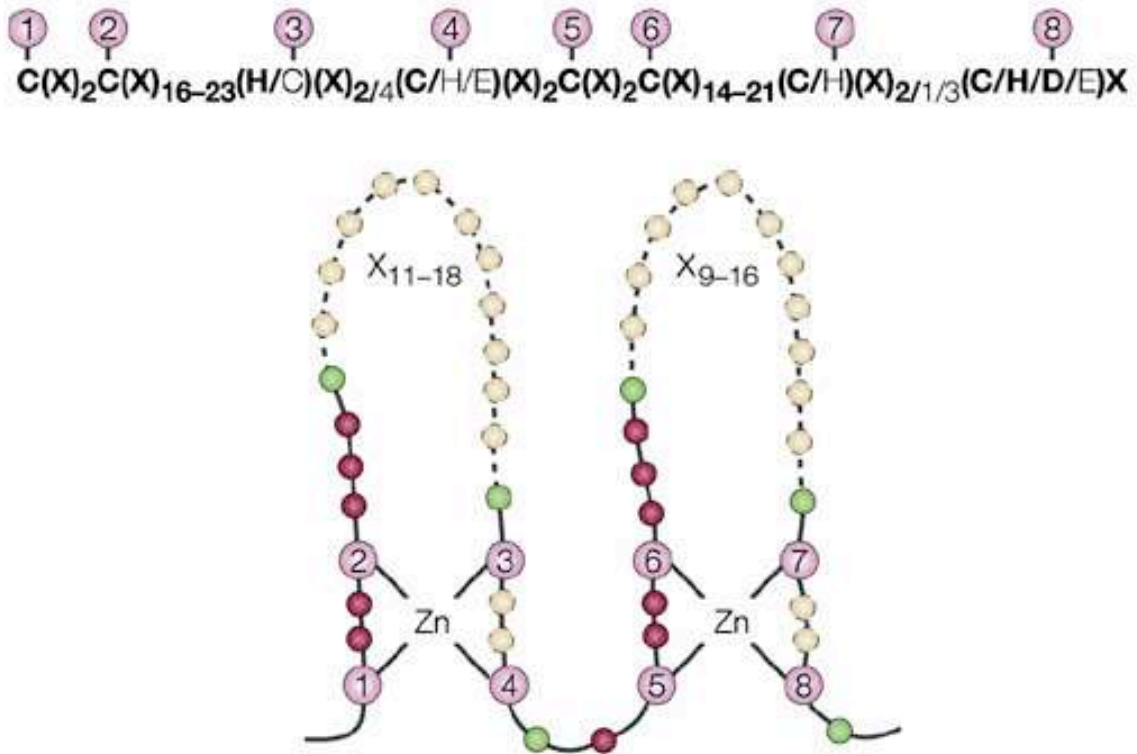


Figure 15 : Séquence et structure du domaine LIM.

Les résidus qui lient les atomes de zinc sont représentés par des sphères roses, les sphères vertes représentent des résidus conservés aliphatiques et les sphères violettes représentent des résidus non conservés. Les sphères jaunes représentent des résidus dont le nombre est variable.

Figure provenant de (Kadmas JL, 2004)

VII. CONCLUSION

Du fait de leur capacité à se lier à une multitude de cibles ARNs mais aussi à une pléthore de partenaires protéiques, les IMPs peuvent contrôler de nombreux processus interconnectés qui relient la stabilisation des ARNs, le transport de l'ARN ou encore le contrôle de la traduction à la polarité cellulaire, la migration ou encore la prolifération cellulaire. De nombreuses études des protéines IMP, et surtout d'IMP-1 et IMP-3, ont été effectuées dans le contexte de cellules cancéreuses humaines, ou pendant le développement embryonnaire. La protéine IMP-2, en revanche, reste relativement à l'écart, et très peu de données sont accessibles quant aux fonctions d'IMP-2 dans les cellules et tissus sains ou cancéreux. Cependant, la protéine IMP-2 est assez différente des autres membres de la famille IMP par sa structure, aussi bien que par son expression dans les tissus, et notamment chez l'adulte. Nous avons étudié les rôles d'IMP-2 dans les cellules du muscle squelettique, où nous avons observé une forte expression de cette protéine, qui semble être nécessaire pour la motilité, pour la prolifération, et pour la différenciation terminale de ces cellules.

Présentation du Projet de Recherche

Contexte

En 2007, le Dr Anna POLESSKAYA m'a proposé un projet de recherche ayant pour but d'étudier l'importance des protéines de liaisons à l'ARN dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse du muscle squelettique. Pour étudier cette régulation, l'équipe que j'ai intégrée, s'appuie sur un modèle de choix très bien décrit dans la littérature et dont le laboratoire est expert la lignée des myoblastes murins C2C12 qui permet de mimer la différenciation du muscle squelettique. Dans ce système musculaire, la prolifération et la différenciation sont deux processus biologiques mutuellement exclusifs.

Ce projet faisait suite à un sujet publié peu avant mon arrivée et qui avait mis en évidence le rôle d'une RBP : LIN-28, une protéine de liaison à l'ARN capable de se fixer sur l'ARNm du gène *igf-II* et d'augmenter de l'efficacité de sa traduction lors de la différenciation musculaire (Polesskaya Anna, 2007). La caractérisation des complexes LIN-28 dans la lignée de myoblastes murins C2C12 en prolifération a permis l'identification de nombreux partenaires protéiques dont la protéine IMP-2. Cette protéine est quant à elle également connue pour sa capacité à lier l'ARNm d'*igf-II* (Nielsen J, 1999). La famille des IMPs, facteurs importants de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes, a été découverte la première fois dans une lignée de cellules cancéreuses de rhabdomyosarcomes où les protéines IMP sont fortement exprimées, tout comme au cours de l'embryogenèse (Nielsen J, 1999). Cependant leur niveau d'expression dans les tissus adultes sains est faible, et la détection d'IMP-2 dans des myoblastes en prolifération est surprenante. Afin de comprendre et de caractériser le rôle d'IMP-2 dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse, le laboratoire a choisi une stratégie qui associe des approches différentes mais complémentaires :

- (i) des expériences de perte de fonction d'IMP-2 par l'utilisation d'ARN interférence dans les myoblastes C2C12
- (ii) l'identification des ARNs cibles régulés par IMP-2 grâce à l'utilisation de puces à ARN recouvrant l'ensemble du génome murin
- (iii) la détection de la présence de ces ARNs cibles au sein des complexes IMP-2 dans les myoblastes C2C12
- (iv) l'identification par spectrométrie de masse des partenaires protéiques d'IMP-2.

Problématique

J'ai ainsi posé l'objectif de mon travail de thèse qui a été de:

« Caractériser la fonction d'IMP-2 au cours de la myogenèse et déterminer son implication dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse »

Cet objectif est intéressant car dans un premier temps IMP-2 a toujours été décrite dans la littérature dans le cas d'un contexte cancéreux. En effet, nous avons fait partie des premiers à décrire son expression élevée dans un contexte physiologique sain chez l'adulte. Le processus de différenciation musculaire des cellules en myotubes dépend de la coordination complexe de facteurs myogéniques, dont un certain nombre est régulé de manière post-transcriptionnelle. Bien que le réseau transcriptionnel qui orchestre la myogenèse du muscle squelettique soit bien documenté, les mécanismes qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse sont encore très peu connus et restent donc à être éclaircis.

PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

RÉSULTATS

Résumé des résultats obtenus et publiés (Boudoukha S et al, 2010)

Afin d'aborder l'étude du rôle d'IMP-2 au cours de la myogenèse, dans un premier temps une analyse globale du transcriptome a été effectuée entre des myoblastes exprimant IMP-2 et des myoblastes où l'expression d'IMP-2 a été inhibée. La validité des résultats de cette analyse a été testée en étudiant la modulation de deux ARNs cibles connus des IMPs, préalablement décrites dans la littérature : IGF-II et l'ARN non codant H19 (Nielsen J, 1999). Dans les expériences de perte de fonction d'IMP-2 par la transfection de siRNA (small interfering RNA) dirigés spécifiquement contre IMP-2, une très forte diminution de l'expression de ces deux ARNs cibles est observée.

En parallèle, nous avons établi des lignées de myoblastes de souris C2C12 exprimant de manière stable la protéine IMP-2 doublement étiquetée Flag-Ha afin de caractériser à la fois des ARNs interagissant avec IMP-2 ainsi que ses partenaires protéiques d'IMP-2. L'utilisation des deux épitopes Flag-Ha va permettre de minimiser les interactions non spécifiques et de réaliser ainsi deux étapes d'immuno-précipitations plus spécifiques. Les deux épitopes ont été placés soit en position amino-terminale soit en position carboxy-terminale afin de limiter l'interférence avec la fonction d'IMP-2 et d'entrer en compétition avec ses partenaires protéiques et/ou ses cibles ARNs. L'utilisation combinée de ces deux stratégies m'a ainsi permis de détecter les ARNs à la fois régulés par IMP-2 et interagissant physiquement avec IMP-2 dans les myoblastes de souris. Parmi les 118 cibles spécifiques d'IMP-2 identifiées, plusieurs ont attiré notre attention notamment un transcrite codant la protéine MuRF-3 (Muscle-specific RING finger protein-3).

MuRF-3 est une protéine exprimée de manière spécifique dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique. Cette protéine est fortement induite lors de la différenciation et est un régulateur du réseau de microtubules (MTs). En effet, MuRF-3 participe à la stabilisation des MTs, qui est très importante pour la différenciation terminale des cellules musculaires (Spencer JA, 2000). La stabilisation des MTs est induite par une dé-tyrosination de l'extrémité C-terminale de l' α -tubuline. Cette modification post-traductionnelle va exposer un résidu glutamine au niveau de l'extrémité C-terminal et ainsi la tubuline va prendre le nom de « Glu-tubuline » (Gundersen GG, 1984) (**figure 16**). Cette forme stable résistante à la dépolymérisation est caractéristique de la différenciation myogénique (Gundersen GG, 1986) mais est aussi souvent observée dans différents types de cancers comme le cancer du sein (Mialhe A, 2001). La présence de la Glu-tubuline dans le cancer du sein corrèle avec une

RÉSULTATS

agressivité élevée des tumeurs et dans les neuroblastomes sa présence est associée à un mauvais pronostic (Kato C, 2004). De plus, elle semble influencer la motilité cellulaire et la capacité métastatique des cellules tumorales. Un autre mécanisme de remodelage du cytosquelette de MTs a lieu au niveau des adhésions focales (AFs), structures indispensables pour l'adhésion cellulaire, la motilité et l'intégrité du cytosquelette (Palazzo AF, 2004). Les AFs constituent comme les MTs un point d'ancrage du cytosquelette. De plus, les AFs constituent des sites de localisation de MTs stables, leur remodelage entraîne une diminution de la forme stable des MTs (Ezratty EJ, 2005)

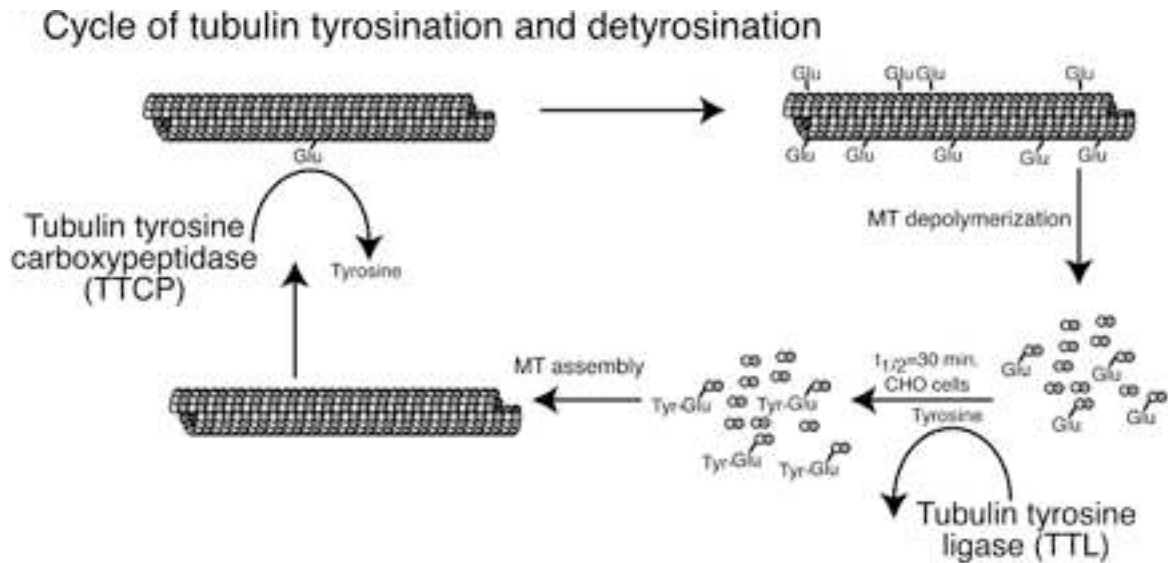


Figure 16 Cycle de tyrosination et de dé-tyrosination de la tubuline.

Représentation schématique du cycle de tyrosination et détyrosination de la tubuline. La tubuline est sujette à des modifications post-traductionnelles spéciales, qui affectent principalement l'extrémité carboxy terminale de la sous-unité α . Lors de l'une de ces modifications, appelée cycle de tyrosination/détyrosination, l'acide aminé en position carboxy terminale de la tubuline α , une tyrosine est cycliquement clivée de la chaîne polypeptidique par une carboxypeptidase inconnue (TCP) et ré-ajoutée à cette même chaîne par la tubuline-tyrosine-ligase (TTL).

Figure provenant {Wordeman L, 2007 #307}

J'ai montré que les niveaux d'expression de Glu-tubuline, MuRF-3 et IMP-2, étaient très élevés dans les cellules de RMS par rapport aux myoblastes sains. Ainsi, mes expériences de perte de fonction d'IMP-2 montrent une diminution du niveau de Glu-tubuline qui corrèle avec la diminution de l'expression de MuRF-3 et qui s'accompagne d'un défaut de la motilité des myoblastes et des RMS. Cette diminution de la motilité a été observée grâce à la réalisation de la technique appelée « wound healing test ». Cette technique consiste en une blessure de la couche monocellulaire sur tapis confluent de cellules. Cette blessure se fait à l'aide d'un cône de pipette 48h après la transfection de siRNA et ensuite des photographies sont prises à différents temps avec un microscope optique. Mes données mettent en évidence d'une part le rôle d'IMP-2 dans le contrôle de la motilité des myoblastes de souris et des cellules de RMS. D'autre part, mes résultats soulignent l'importance d'IMP-2 dans la stabilisation des MTs via l'accumulation de la Glu-tubuline.

L'analyse globale du transcriptome dans les myoblastes et l'étude des transcrits liés à IMP-2 nous ont permis d'identifier un autre ARNm : *Pinch-2* (**P**articularly **I**nteresting **N**ew **C**ystein-**H**istidine-rich protein). En effet, l'ARNm de *pinch-2* est le transcrit le plus surexprimé en absence d'IMP-2. A l'inverse une diminution de l'expression de l'ARNm de *pinch-2* est observée après surexpression d'IMP-2. PINCH-2 est une protéine qui possède un domaine LIM riche en cystéine, caractéristique des facteurs de transcription et des protéines du cytosquelette (Dawid IB, 1995) (voir chapitre III). Cette protéine PINCH-2 est décrite comme un médiateur du remodelage des AFs et sa surexpression conduit à une diminution de la motilité cellulaire et à un défaut dans l'étalement des cellules (Yang Y, 2008). Mes résultats montrent très clairement que la surexpression de PINCH-2 dans les myoblastes conduit à un changement important de la morphologie des cellules. En effet, ce même phénotype est observé dans les myoblastes et les cellules de RMS dans lesquels l'expression d'IMP-2 a été artificiellement diminuée. L'utilisation de marqueurs spécifiques des AF (comme les anticorps contre la vinculine ou contre la phospho-tyrosine) révèle que la surexpression de PINCH-2 entraîne une modification dans la localisation subcellulaire des AFs. On observe qu'en absence d'IMP-2, les AFs forment des agrégats à la périphérie de la cellule et que les MTs stables ont disparu de la proximité des AFs.

Conclusions

Mes résultats montrent très clairement que l'inhibition d'IMP-2 dans les myoblastes et les cellules de RMS conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm *pinch-2* d'un facteur cinq par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation conduit à l'apparition de différents phénotypes :

- une diminution de la motilité des cellules
- une diminution du niveau de MTs stables (Glu-tubuline)
- une agrégation dans les structures des AF

Par des expériences de gain ou de perte de fonction et de retard sur gel, j'ai pu établir que la protéine IMP-2 régule l'expression de *Pinch-2* et *MuRF-3* via une interaction directe avec leur ARNm. Jusqu'à présent dans la littérature, il a été montré qu'IMP-2 entraîne une diminution de l'expression de la majorité de ses cibles comme pour MuRF-3, nous avons par contre pu mettre en évidence l'augmentation de l'expression de plusieurs de ces cibles dont le transcrit *pinch-2* sur lequel s'est porté mon intérêt afin de déterminer plus précisément les mécanismes de régulation impliquant la protéine IMP-2.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES (Article en préparation)

I. La région 3'UTR de *pinch-2* est ciblée par les miRNAs de la famille let-7

Les résultats montrent qu'IMP-2 s'associe à différentes protéines et appartient à différents complexes. De plus, son implication dans le contrôle de la stabilité et de la traduction m'ont conduit à étudier en détails la région 3'UTR de l'ARNm de *pinch-2*. Plusieurs travaux récents ont mis en évidence que les régions 3'UTR sont les cibles de régulateurs protéiques comme les RBPs et de miRNAs. Ces derniers inhibent l'expression des gènes en s'associant à la région 3'UTR de leurs messagers cibles, et entraînent de ce fait soit la dégradation des messagers cibles, soit l'inhibition de la traduction de ces messagers (Bagga S, 2005; Krol J, 2010; Lim LP, 2005).

Pour tester, mon hypothèse de travail selon laquelle la régulation de l'expression du messenger *pinch-2* est dépendante des miRNAs, j'ai examiné dans un premier temps l'implication du complexe *RISC* (*RNA-Induced Silencing Complex*) dans ce processus. Les protéines Argonautes (Ago) constituent des facteurs qui font partie intégrante du complexe *RISC* ; il existe quatre protéines Ago chez les Mammifères : Ago1-4, mais il semblerait que seule Ago-2 soit impliquée dans le clivage de l'ARNm (Hutvagner G, 2008a; Hutvagner G, 2008b; Liu J, 2004). L'inhibition de l'expression *Ago-2* par des siRNA dans les myoblastes C2C12 révèle une très forte augmentation du niveau d'expression du messenger *pinch-2* (**figure 17**), ainsi que de la protéine PINCH-2 (**figure 18**) par rapport aux cellules contrôles transfectées avec des siRNA contrôles. Ces résultats soutiennent fortement l'idée selon laquelle l'expression de *pinch-2* est régulée par des miRNAs.

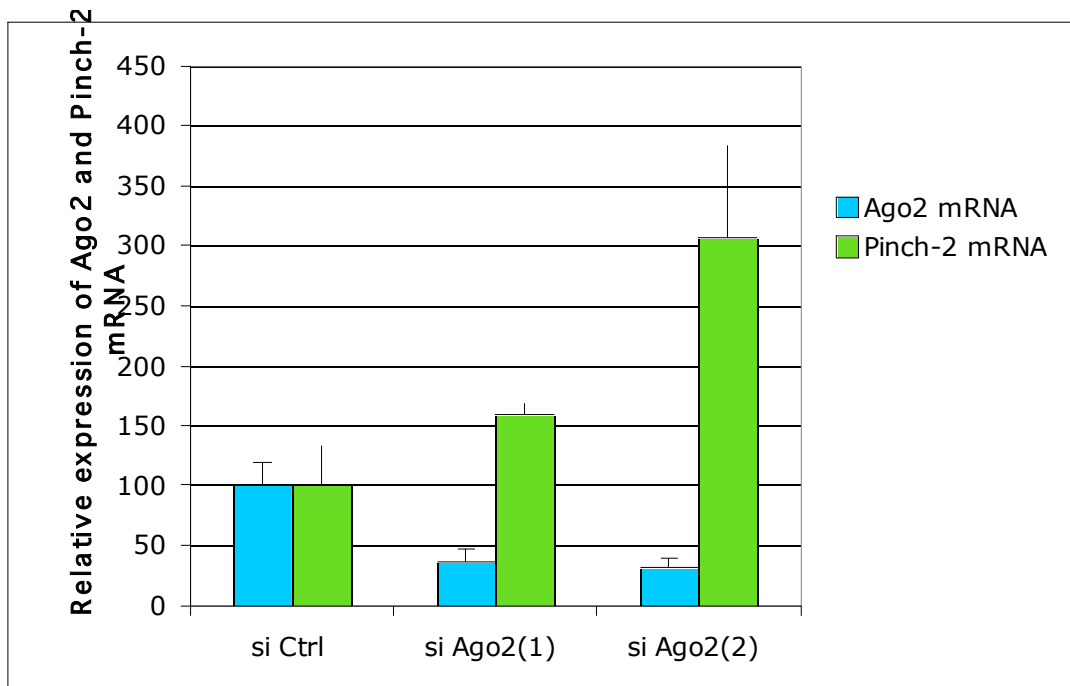


Figure 17 : Régulation du transcrite *pinch-2* par les miRNA.

48 heures, après la transfection de siRNA dirigés contre Ago2 dans les myoblastes C2C12, le niveau de l'ARNm de *pinch-2* a été analysé par qRT-PCR et normalisé avec l'ARNm de la *cyclophiline A*

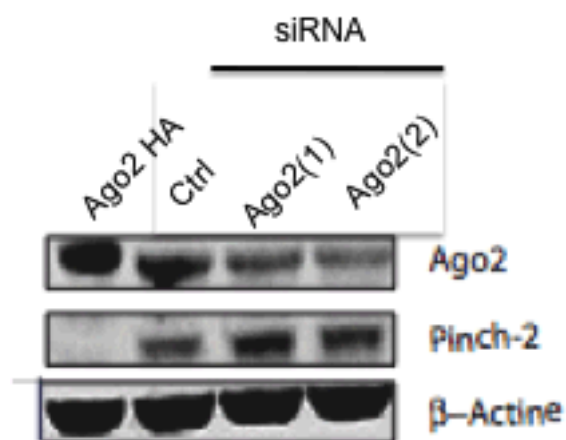


Figure 18 : L'inhibition de l'expression d'Ago2 entraîne l'augmentation du niveau d'expression de la protéine PINCH-2

48 heures après la transfection de siRNA dirigés contre Ago2 dans les myoblastes C2C12, le niveau de la protéine PINCH-2 a été évaluée par Western Blot. La β -actine est utilisée comme contrôle d'équicharge de dépôt.

Afin de confirmer la régulation post-transcriptionnelle de *pinch-2* par des miRNAs, la première étape a été la recherche de potentiels sites de fixation de miRNA dans sa région 3'UTR. L'analyse bioinformatique en utilisant plusieurs logiciels algorithmes de prédictions : TargetScan {Lewis BP, 2003 #302}, PicTar {Krek A, 2005 #303}, miTarget {Kim SK, 2006 #304} a révélé l'existence de plusieurs sites de liaison de miRNAs dont quatre sites potentiels de liaison du miRNA *lethal-7* (*let-7*) dans la région 3' UTR du messenger de *pinch-2* (**figure 19**). Ce miRNA qui a été initialement découvert comme essentiel au développement du nématode *C. elegans* est très bien conservé à travers les espèces (Reinhart BJ, 2000). Chez la souris, la famille *let-7* comporte 14 membres, parmi lesquels on retrouve 8 isoformes de *let-7* différant par un ou quelques nucléotides ((Roush S, 2008) (**tableau 5**)).

Puisque *let-7* présente des sites potentiels de liaison à la région 3'UTR de l'ARNm de *pinch-2* et que *let-7* est exprimé dans le muscle squelettique(Drummond MJ, 2011), nous avons décidé de déterminer si *pinch-2* est effectivement régulé par *let-7* dans notre modèle musculaire. Dans cette optique, nous avons réalisé des expériences de perte de fonction de *let-7* via l'utilisation d'anti-sens dirigés spécifiquement contre ce miRNA. Pour l'efficacité optimale, nous avons utilisés des anti-sens LNA (locked nucleic acid) (Naguibneva I, 2006a). Les résultats obtenus révèlent la diminution de l'expression de *let-7* entraîne une augmentation significative de l'expression du messenger *pinch-2* (**figure 20**), montrant ainsi que *let-7* peut réguler de manière négative l'expression de *pinch-2*.

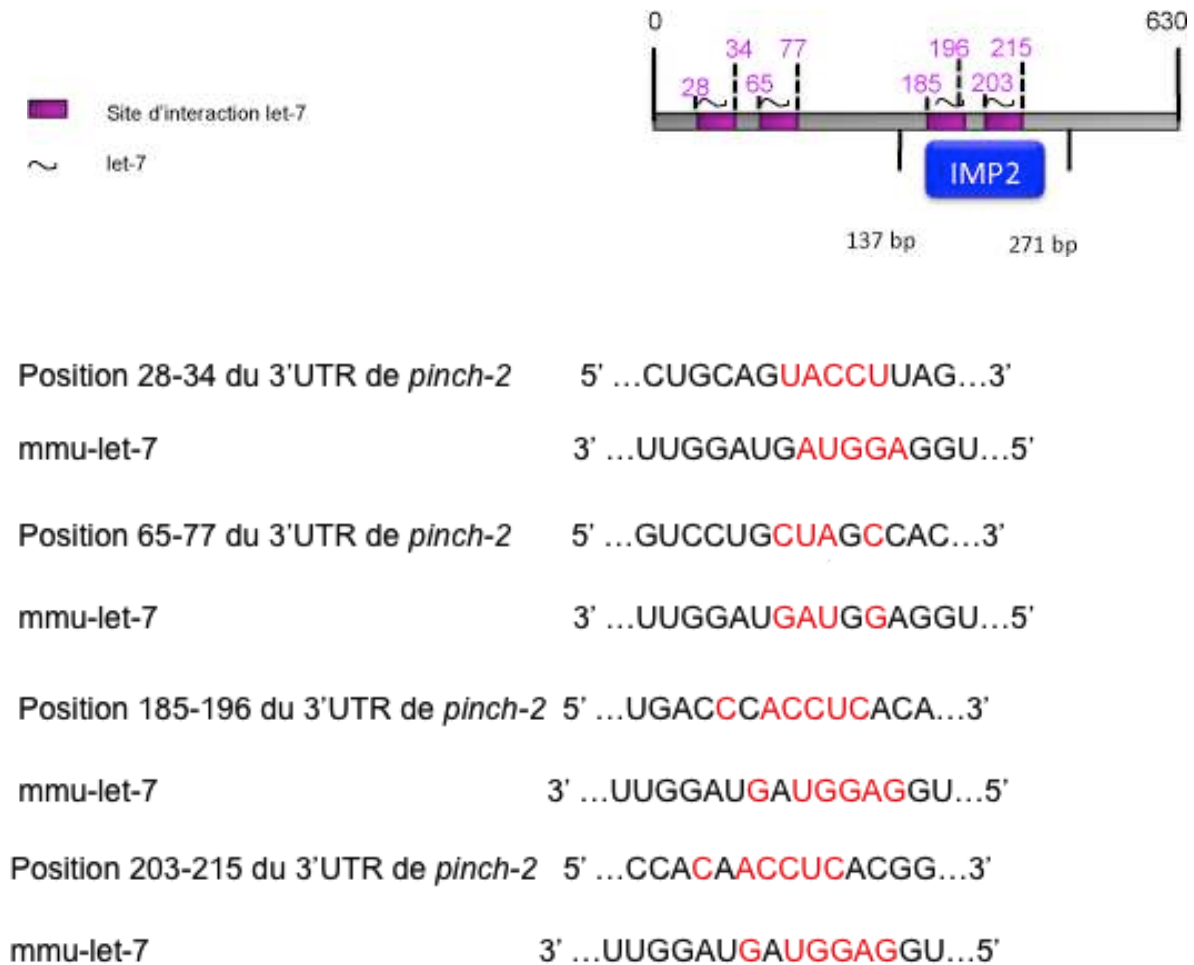


Figure 19 : Schéma représentant les sites d'interactions prédits entre la région 3'UTR de *pinch-2* et le miRNA *let-7* chez la Souris.

Les rectangles violets représentent les sites d'interaction du miRNA *let-7* présents dans la région 3'UTR. La région d'interaction entre IMP-2 et la région 3' UTR de l'ARNm *pinch-2* située entre les nucléotides 137 et 271, comporte également deux sites d'interaction avec *let-7*.

Les séquences d'interaction « seed » écrites en rouge représentent les sites potentiels prédits d'interaction de *let-7* avec la région 3'UTR de *pinch-2*.

| miRNA de la famille let-7 | Séquence du miRNA mature |
|---------------------------|-------------------------------|
| mmu-let-7a | 5' UG AGGUAGUAGGUUGUAUAGUU 3' |
| mmu-let-7b | 5' UG AGGUAGUAGGUUGUGUGGUU 3' |
| mmu-let-7c | 5' UG AGGUAGUAGGUUGUAUGGUU 3' |
| mmu-let-7d | 5' AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU 3' |
| mmu-let-7e | 5' UG AGGUAGGAGGUUGUAUAGUU 3' |
| mmu-let-7f | 5' UG AGGUAGUAGAUUGUAUAGUU 3' |
| mmu-let-7g | 5' UG AGGUAGUAGUUUGUACAGUU 3' |
| mmu-let-7i | 5' UG AGGUAGUAGUUUGUCUGUU 3' |

Tableau 5 : Exemple des isoformes des membres miRNA de la famille let-7.

En rose sont représentés les nucléotides qui diffèrent de ceux qui sont présents dans la séquence nucléotidique de miRNA mature mmu-let-7a (mmu : mouse musculus).

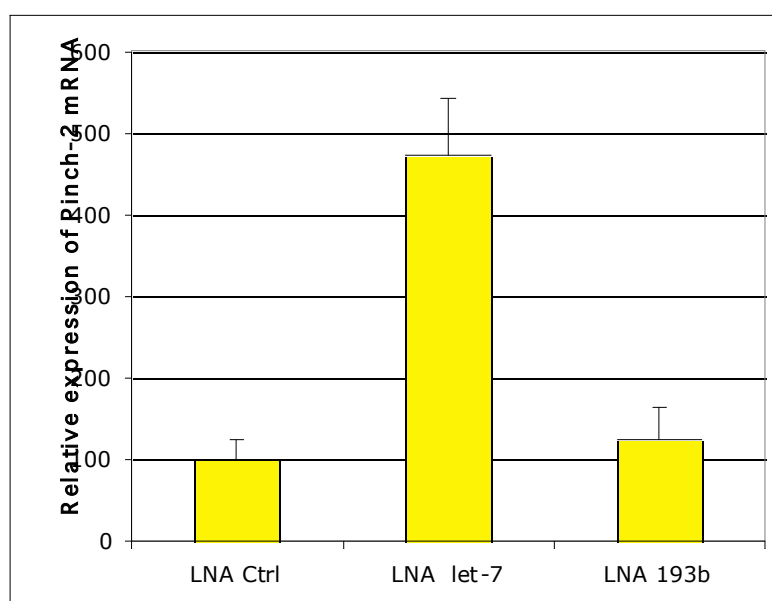


Figure 20 : L'inhibition de let-7 entraîne l'augmentation de l'expression du messager *pinch-2* dans les C2C12.

48 heures, après la transfection de LNA dirigés contre let-7 dans les myoblastes C2C12, le niveau de l'ARNm de *pinch-2* a été analysé par qRT-PCR et normalisé avec l'ARNm de la *cyclophiline A*. D'après les analyses bioinformatiques, la région 3'UTR de *pinch-2* ne présente pas de séquences régulatrices par le miR-193b, c'est pourquoi miR-193b a été utilisé comme contrôle négatif dans cette expérience.

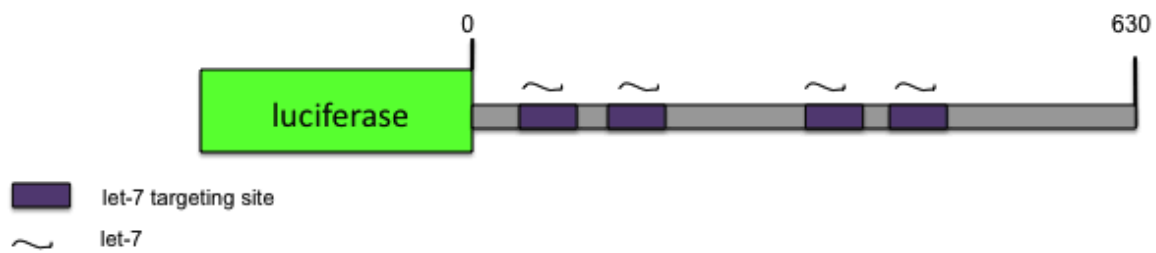


Figure 21 : Schéma représentant la région 3'UTR de *pinch-2* fusionnée au gène rapporteur *luciférase*.

La boîte grise représente la région 3'UTR de *pinch-2* de 630 paires de bases et les boîtes mauves correspondent aux sites d'interaction avec let-7.

RÉSULTATS

Afin d'établir la contribution de la région 3'UTR de *pinch-2* dans cette régulation, cette région a été clonée immédiatement en aval du gène rapporteur de la *luciférase* (**figure 21**). Cette construction a été co-transfectée dans les myoblastes C2C12 avec des précurseurs de miRNA qui permettent d'augmenter le niveau d'expression des miRNA matures endogènes. L'expression du rapporteur est diminuée de manière significative et spécifique en présence du miRNA *let-7* (**figure 22**). Ce résultat confirme l'existence d'une régulation de *pinch-2* par le miRNA *let-7* et implique directement la région 3'UTR de *pinch-2* dans cette régulation. Il reste maintenant à réaliser la mutation de l'un, l'autre ou l'ensemble des sites potentiels de *let-7* pour identifier le ou les sites réellement concernés.

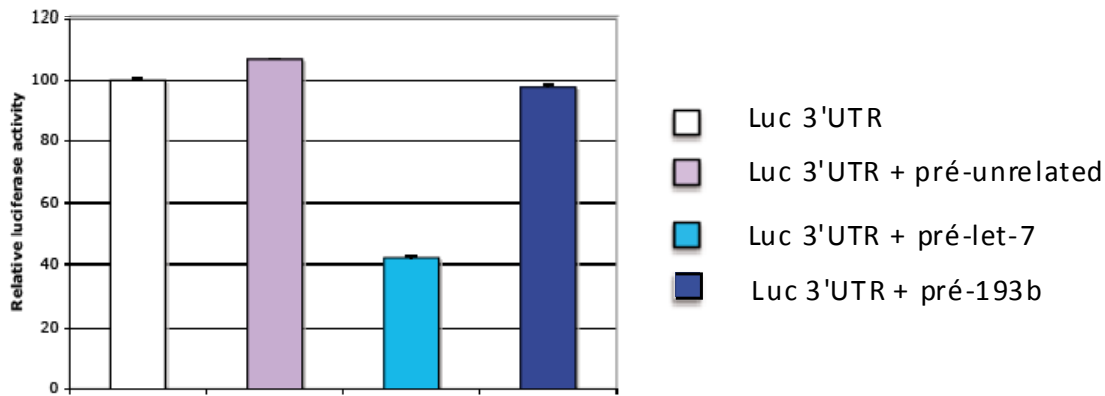


Figure 22 : Régulation directe de l'expression de *pinch-2* par *let-7*.

La mesure de l'activité luciférase a permis de montrer l'interaction directe entre la région 3'UTR de *pinch-2* et *let-7*. La présence du précurseur-*let-7* (pré-*let-7*) entraîne une diminution de l'activité luciférase (Luc 3'UTR) alors que la présence du précurseur contrôle (pré-unrelated) et de pré-193b n'ont aucune influence sur l'activité luciférase. miR-193b a été utilisé comme contrôle négatif dans cette expérience. NB : les écart-types ont été calculés et sont présents sur le graphique mais son trop petits pour être visibles.

II. *let-7* est impliqué dans la migration cellulaire

La protéine PINCH-2 joue un rôle très important dans l'assemblage des adhésions focales (AFs) qui constituent de larges complexes moléculaires impliqués dans la transmission mécanique et biochimique de l'information entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, régulant ainsi différents processus cellulaires comme la migration des cellules ou encore « l'étalement cellulaire ». La localisation correcte de PINCH-2 au niveau des AFs dépend de sa liaison avec la protéine PINCH-1 au complexe *integrin-linked kinase* (ILK). Comme nos résultats l'indiquent, l'expression de *pinch-2* est modulée par *let-7*. De ce fait, nous nous sommes interrogés sur le potentiel rôle *in vivo* que pourrait jouer *let-7* dans la régulation de la migration des myoblastes. Des expériences de blessure de la couche monocellulaire ou « wound healing assay » nous, ont permis de souligner l'importance de *let-7* dans ce mécanisme. En effet, les cellules transfectées avec l'anti-sens dirigé spécifiquement contre *let-7* dans les myoblastes accusent un retard dans le recouvrement de la blessure initialement infligée par rapport aux myoblastes traités avec un anti-sens contrôle (**figure 23**) montrant que l'inhibition de *let-7* avait pour conséquence la diminution de la migration des myoblastes. Pour montrer que cet effet dépend de *pinch-2*, il faudrait maintenant tester si l'inhibition de *pinch-2* et de *let-7* entraîne un retour à une motilité comparable aux cellules contrôles.

Afin de déterminer de quelle manière *let-7* agit sur la modulation de la migration, nous nous sommes focalisées dans l'observation des AFs, celles-ci ont été immuno-marquées avec des marqueurs spécifiques des AFs comme la phospho-tyrosine (Vuori, 1998). L'absence de *let-7* dans les myoblastes semble influencer la distribution des AFs. En effet, les AFs constituent des structures bien individualisées qui se retrouvent en périphérie de la cellule dans un contexte physiologique. Cette distribution se retrouve perturbée lorsqu'on inhibe l'expression de *let-7*, les AFs vont constituer des agrégats de taille différente à la périphérie des cellules (**figure 24**). Cette observation rejoint celle observée dans les myoblastes qui présentent une inhibition d'IMP-2. L'ensemble de ces résultats suggère que *let-7* est impliqué dans le remodelage des AFs en régulant l'expression de *pinch-2* qui est essentielle, comme nous l'avons vu précédemment dans le contrôle de la migration des myoblastes.

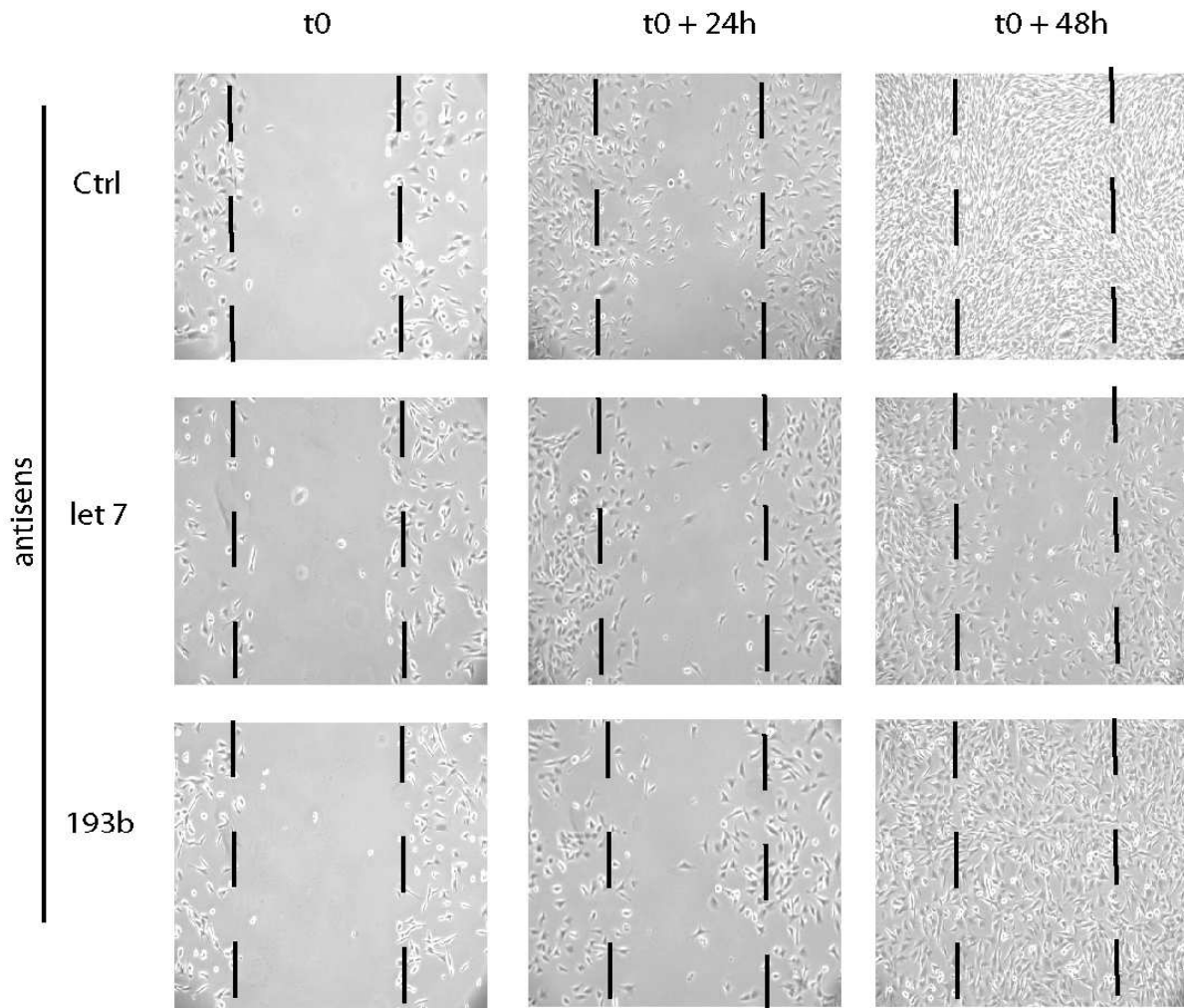


Figure 23 : L'inhibition de let-7 entraîne un défaut de motilité dans les myoblastes C2C12.

Les myoblastes ont été transfectées avec des LNA contrôle et dirigés spécifiquement soit contre let-7 soit contre miRNA-193b (contrôle négatif). Une blessure de la couche monocellulaire sur tapis confluent de cellules a été réalisée au temps t0 (48h post-transfection). Puis les photos ont été prises 24h (t0+24) et 48 h (t0+48) après la blessure avec un microscope optique à objectif 10X.

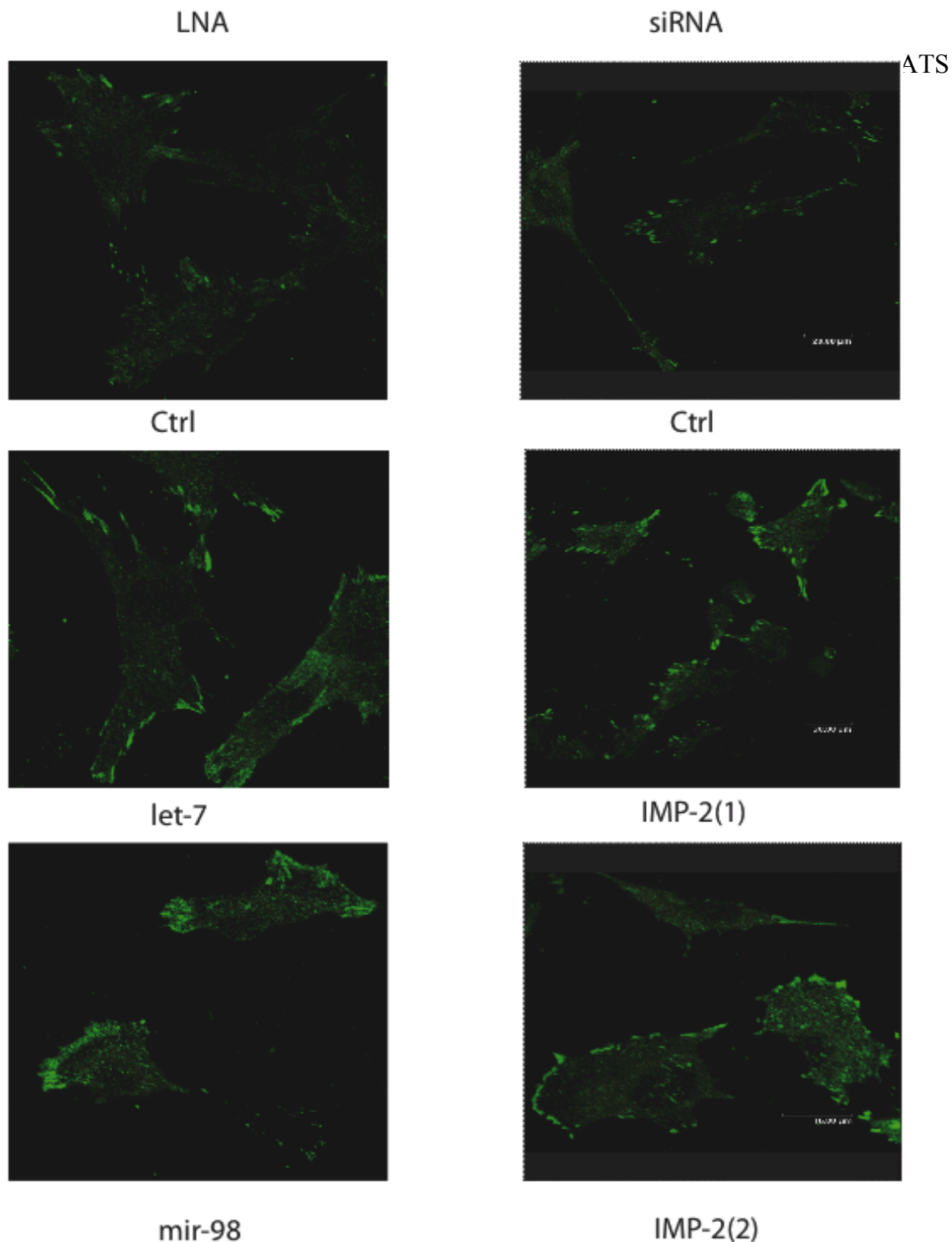


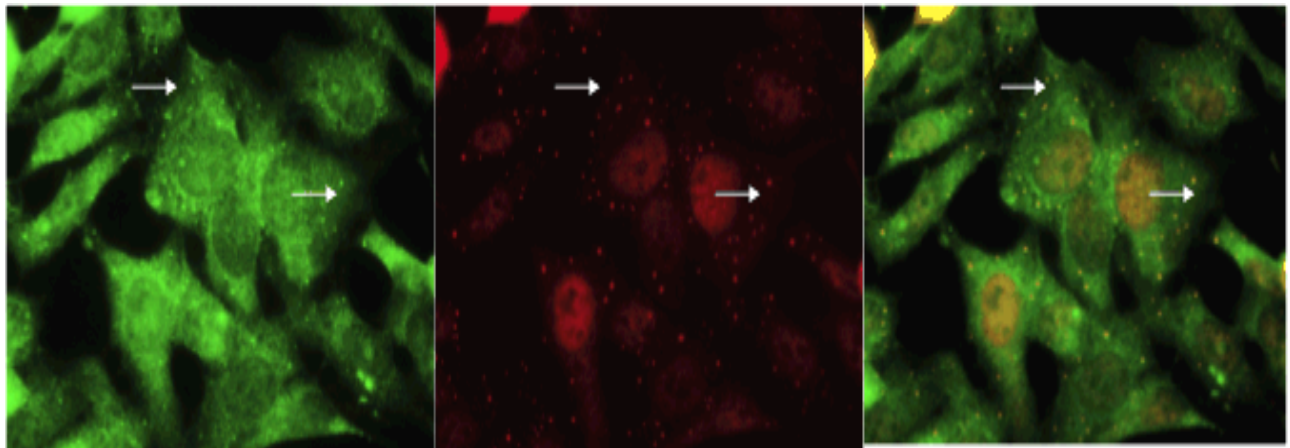
Figure 24 : Immuno-marquage des AFs avec un marqueur phospho-tyrosine dans les cellules C2C12 qui ont été transfectées avec différents siRNA contre IMP-2 ou des antisens contre let-7.

Pour chaque expérience, deux siRNAs ou LNAs ont été utilisés dirigés spécifiquement contre IMP-2 (IMP-2 (1) et IMP-2(2)) et let-7g/miR-98. miR-98 appartient à la même famille que let-7g et le LNA anti-miR-98 a été utilisé comme un deuxième anti-sens pour inhiber la famille let-7. On remarque que la diminution de l'expression de let-7 entraîne une distribution agglomérée des adhésions focales, phénotype qui rappelle celui observé dans les cellules où l'expression d'IMP-2 est diminuée.

III. *let-7* et IMP-2 : une même voie de régulation de *pinch-2* ou co-régulent-ils *pinch-2* ?

Nous avons précédemment observé que la RBP IMP-2 régule l'ARNm de *pinch-2* (Boudoukha S, 2010). Les résultats que nous venons de présenter montrent que *let-7* se fixe également à la région 3'UTR de *pinch-2* et régule son expression, suggérant qu'il pourrait exister une possible coopération entre IMP-2 et *let-7* dans la régulation de l'expression de *pinch-2*. Plusieurs résultats appuient cette hypothèse. Tout d'abord l'analyse des complexes IMP-2 isolés dans les lignées de myoblastes exprimant IMP-2 Flag-Ha a permis d'identifier la présence de partenaires protéines comme Ago2 composante du complexe RISC, et l'ARN hélicase MOV10 (Moloney leukemia virus 10) qui est requise à la fois pour favoriser la dégradation et/ou l'inhibition de l'ARNm par les miRNA. Ces deux protéines sont présentes dans les Processing Bodies (P-Bodies) (**figure 25**) {Chendrimada TP, 2007 #301} qui concentrent la majorité des acteurs de la dégradation ou de la répression des ARNm. De façon intéressante, IMP-2 est présente de manière diffuse dans le cytoplasme, mais se concentre également dans les P-Bodies identifiés par la présence du marqueur Gemin 1 (Ge1) {Yu JH, 2005 #299} {Fan SJ, 2011 #300}. De plus, la recherche par la méthode de TaqMan Low Density Array© de miRNA dans l'immuno-précipitat à partir de cellules IMP-2 Flag-Ha a révélé la présence de deux membres de la famille *let-7* ainsi que d'autres miRNA (**tableau 6**).

Pour savoir si ces deux régulateurs interviennent dans deux voies indépendantes ou dans une même voie de signalisation, nous avons réalisé des expériences de perte de fonction en inhibant soit l'un des régulateurs soit les deux simultanément. Trois de ces expériences ont montré que dans les myoblastes l'inhibition indépendante ou simultanée de *let-7* et IMP-2 par des siRNA et des LNA entraîne une augmentation de l'expression du transcrit *pinch-2* comparable (**figure 26**). Au niveau protéique, nous observons les mêmes résultats : en effet le niveau d'expression de PINCH-2 est comparable dans les myoblastes qui sont traités uniquement avec le LNA *let-7* ou le siARN IMP-2 ou dans les doubles mutants (KD *let-7* et IMP-2) (**figure 27**). Ces résultats suggèrent que *let-7* et IMP-2 interviennent dans une même et unique voie pour réguler l'ARNm de *pinch-2* au niveau post-transcriptionnelle probablement via sa région 3'UTR.



IMP-2

Ge1: Processing Bodies marker

Merge

Figure 25 : Co-immunomarquage des granules IMP-2 et des P-Bodies dans les cellules de rhabdomyosarcomes (RMS).

Les cellules de RMS présentent une localisation nucléaire et cytoplasmique diffuse d'IMP-2 qui se trouve également concentré dans des granules qui contiennent la protéine Ge1 marqueur reconnu P-Bodies.

| miRNA enrichis dans les complexes IMP-2 |
|--|
| miR-16 |
| miR-24 |
| miR-181 |
| miR-191 |
| miR-206 |
| miR-301 |
| let-7c |
| let-7a |

Tableau 6 : Liste non exhaustive des miRNA trouvés enrichis dans les complexes IMP-2.

Les miRNA ont été détectés et quantifiés par la méthode de TaqMan Low Density Array (TLDA) à partir d'ARN provenant des complexes IMP-2 des myoblastes.

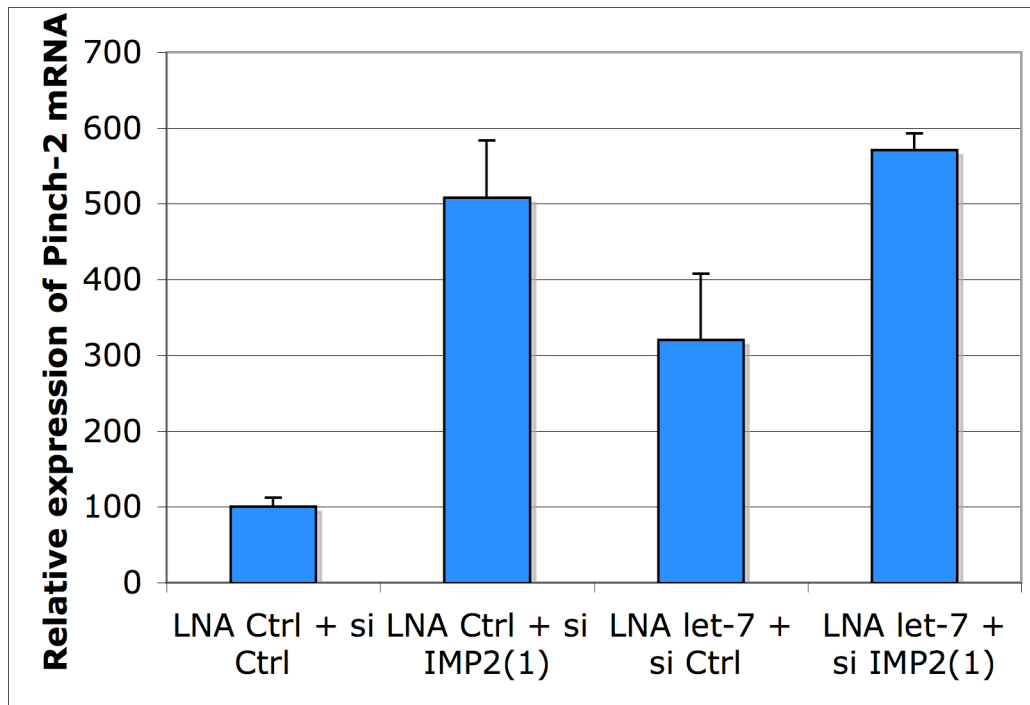


Figure 26 : let-7 et IMP-2 régulent ensemble l'expression du transcrit *pinch-2*.

48 heures, après la transfection de siRNA dirigés contre IMP-2 et des antisens contre let-7 dans les myoblastes C2C12, le niveau de l'ARNm de *pinch-2* a été analysé par qRT-PCR et normalisé avec l'ARNm de la *cyclophiline A*.

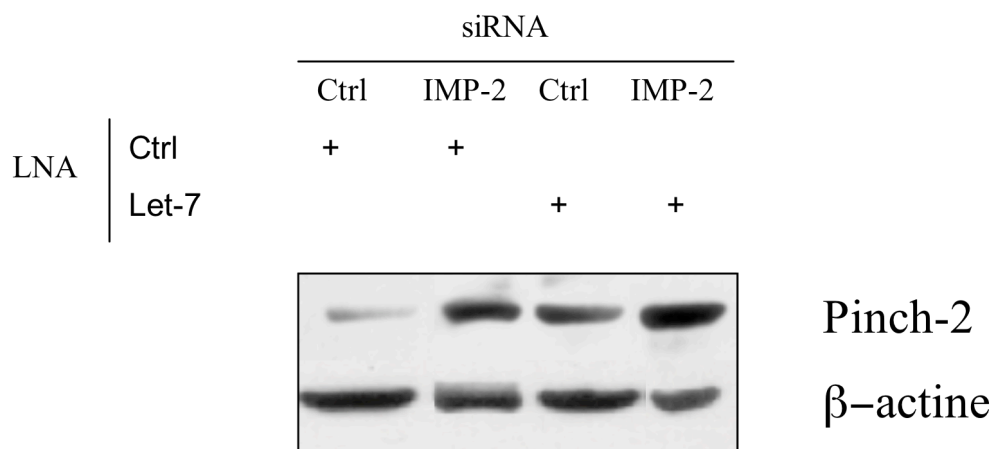


Figure 27 : let-7 et IMP-2 interviennent tous les deux dans la régulation de l'expression de PINCH-2.

Suite à l'inhibition individuelle de Pinch-2 et de let-7 par des LNA et ses siRNA ou de leur inhibition conjointe, le niveau de PINCH-2 a été évalué par Western Blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle de dépôt. Ctrl : contrôle

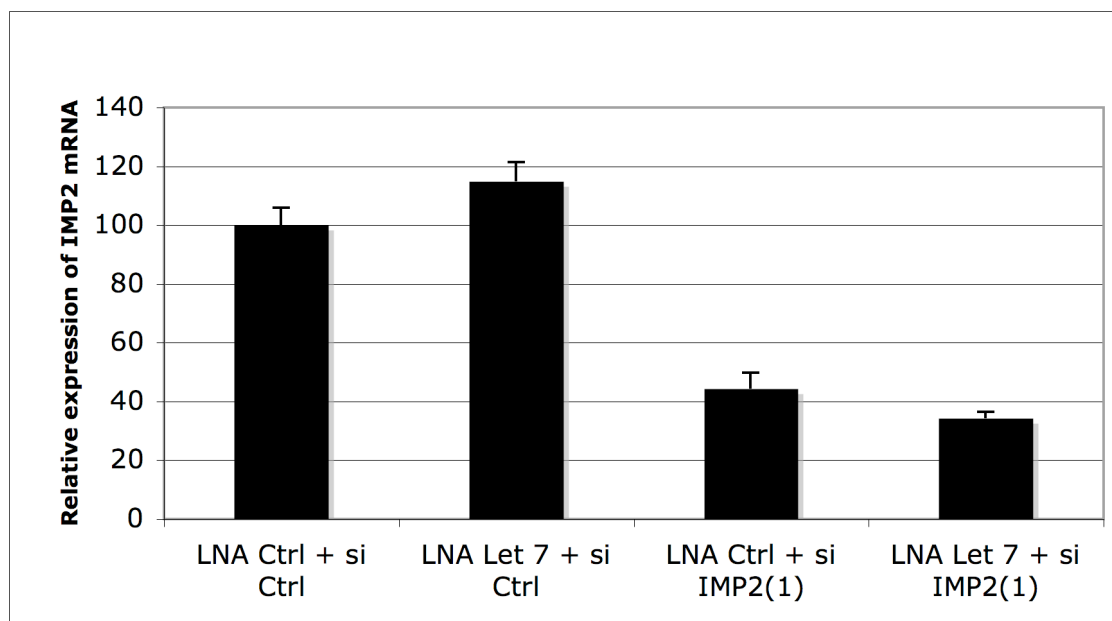


Figure 28. Le transcrit *imp-2* n'est pas régulé par *let-7* dans les myoblastes C2C12.

48 heures après la transfection de siRNA dirigés contre IMP-2 et des antisens *let-7* dans les myoblastes C2C12, le niveau de l'ARNm d'*imp-2* a été par qRT-PCR et normalisé avec l'ARNm de la *cyclophiline A*.

Dans les cellules humaines A549 et HepG2, l'ARNm *d'imp-2* présente une expression diminuée suite à la transfection du miRNA let-7 (Boyerinas B, 2008). Nous avons donc contrôlé l'expression d'IMP-2 en fonction de l'expression de let-7 et nous avons observé que dans les myoblastes IMP-2 n'est pas régulé par let-7 (**figure 28**). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de pinch-2 lorsqu'on inhibe l'expression de let-7 est bien spécifique de let-7 et est non due à une dérégulation de l'expression d'IMP_2 par let-7.

V. Conclusions

Nous avons mis en évidence une nouvelle voie de régulation post-transcriptionnelle de *pinch-2* dans les myoblastes, impliquant la protéine se liant à l'ARN IMP-2 et le miRNA let-7. En ce qui concerne IMP-2, nous avons mis en évidence l'importance d'IMP_2 dans la migration cellulaire des myoblastes. De plus, nos données récentes montrent que tout comme IMP-2, let-7 est impliqué dans le remodelage des adhésions focales et suggèrent que cette activité se fait via la modulation de l'expression de pinch-2.

Discussion

DISCUSSION

Le domaine du métabolisme de l'ARN a énormément évolué ces dernières années, surtout depuis la découverte et la caractérisation des miRNAs (Lee RC, 1993). Cette avancée a permis ainsi une grande expansion de la recherche dans le domaine de la régulation post-transcriptionnelle (Bandziulis RJ, 1989). Elle a également ravivé l'intérêt concernant les protéines de liaison à l'ARN (RBPs). Ces études ont permis de montrer qu'à travers la présence des RBPs dans des complexes ribonucléoprotéiques, les RBPs étaient impliquées dans de nombreux aspects de la biogenèse des ARNs depuis leur synthèse jusqu'à leur dégradation (Glisovic T, 2008).

1. Validation de la stratégie d'approche.

Avant notre étude, l'ensemble de la famille des IMPs a fait l'objet de multiples recherches menées pour la plupart par le laboratoire de F.C. Nielsen et de J. Christianssen. L'une de ces premières recherches a permis d'identifier et caractériser ces protéines qui présentent une forte affinité de liaison à l'ARN IGF-II *leader 3* et qui répriment sa traduction (Nielsen J, 1999). Les fonctions d'IMP-3 mais surtout d'IMP-1 sont bien documentées. Cependant aucune étude focalisée sur la fonction d'IMP-2 n'était publiée lors du démarrage de mon projet et d'ailleurs aucune n'a été publiée avant 2010. Ayant identifiée IMP-2 comme un partenaire protéique présent dans le macro-complexe LIN-28, l'équipe du Dr Anna Polesskaya a entrepris de déterminer le(s) rôle(s) de cette protéine dans la régulation post-transcriptionnelle au cours de la myogenèse et mon sujet de thèse a porté sur ce sujet.

L'idée originale de notre stratégie a été d'opter pour une approche globale qui combinait deux techniques : (i) la première consistait à comparer l'ensemble du transcriptome murin entre des myoblastes qui présentaient une inhibition de l'expression d'*imp-2* et des myoblastes contrôles pour caractériser les cibles ARNs d'IMP-2, (ii) la deuxième reposait sur la création d'une lignée stable de myoblastes qui exprimaient de manière constitutive la protéine chimérique IMP-2 avec les étiquettes Flag et Hémagglutinine (HA) et ainsi identifier par double immuno-précipitation, à la fois les partenaires protéiques d'IMP-2 et les ARNs qui interagissaient avec IMP-2.

L'analyse du transcriptome a permis de révéler la présence des ARNs *igf-II* et *H19* dont les expressions sont régulées de manière négative en absence d'IMP-2. Ces deux ARNs sont également détectés dans les complexes IMP-2 étiquetés provenant des myoblastes. Ces résultats nous confortent sur la pertinence de notre stratégie expérimentale puisqu'elle permet

DISCUSSION

d'identifier deux ARNs connus pour être des cibles de la famille des IMPs décrites dans la littérature (Nielsen J, 1999).

II. Analyse transcriptomique et protéomique des complexes IMP-2

Les résultats obtenus à partir de l'analyse du transcriptome ont permis de détecter plus de 1000 ARNs qui sont retrouvés régulés de manière différentielle entre les myoblastes contrôles et ceux qui présentent une diminution de l'expression d'IMP-2. Dans un premier temps, ces données nous sont apparues assez surprenantes, d'une part par le nombre important des cibles potentielles d'IMP-2 et d'autre part par le fort pourcentage d'ARNs (environ 80%) dont l'expression est dérégulée de manière positive. Le nombre important de cibles suggère qu'un certain nombre pourrait être des cibles indirectes d'IMP-2, et que d'autres pourraient être non spécifique (« effet off-target »). La forte proportion de cibles « up-régulées » d'IMP-2 pourrait résulter de la transfection de petits ARNs qui perturbe de manière globale l'expression de gènes dépendant de régulations endogènes par les miRNAs. En effet, l'étude de plus de 150 publications a fait l'objet d'une communication qui a permis de souligner qu'à la suite de transfusions de siRNAs, il avait été observé une importante augmentation de l'expression de gènes comme ceux qui sont impliqués dans le cycle cellulaire (Khan A, 2009). Une des explication de ce phénomène serait d'une part la saturation du complexe RISC et d'autre part l'existence d'une compétition dans la liaison du complexe RISC entre les siRNAs transfectés et les miRNAs endogènes (Khan A, 2009).

Néanmoins le grand nombre de cibles identifiées dans notre étude rejoint en partie le travail publié en 2010 par le laboratoire du Dr T. Tuschl (Hafner M, 2010). Cette étude qui est basée sur une approche de « crosslinking » *in vivo* dans des cellules embryonnaires de rein (HEK293) a pour but de déterminer de manière très résolutive, les sites de liaisons de RBPs et des miRNAs au niveau de l'ensemble du transcriptome. La technique du PAR-CLIP (**P**hotoactivable-**R**ibonucleoside-**E**nhanced **C**rosslinking and **I**mmunoprecipitation) est développée à partir d'une technique de « crosslinking » mais son efficacité a été améliorée par l'incorporation dans le milieu de culture de nucléosides photo activables qui vont par la suite être intégrés lors de la transcription. En effet, l'équipe de Tuschl a retrouvé environ 100 000 séquences reconnues par la famille des IMPs qui correspondent à 8400 ARNm codant des protéines. De plus, ils ont remarqué que plus de 75% des 1000 premiers ARNs identifiés

DISCUSSION

partagent une séquence proposée comme une séquence consensus CAUH où H peut correspondre aux nucléotides suivants A, C ou encore U.

Bien que plusieurs séquences de reconnaissance de l'ARN (**RNA Recognition-Element** ou RRE) par les protéines IMP (IMP-RRE) aient été proposées par différents laboratoires, aucune d'entre elles ne fait l'unanimité au sein de la communauté scientifique. Une des séquences proposées, qui se retrouve enrichie dans les cibles ARNm d'IMP-1 est la séquence CCYHHCC où Y correspond à une adénine ou à un uracile et H est soit une cytosine, un uracile ou une adénine (Johnson L, 2007). Une autre séquence suggérée est la séquence UUUUAU ou UUUUAC. Chez la drosophile, ce motif a été identifié 13 fois dans la région 3'UTR du transcrit *oskar*. Cette séquence n'est pas uniquement importante pour la liaison de la protéine IMP de la drosophile à l'ARNm *oskar* mais qu'elle est aussi nécessaire à l'activation de la traduction de cet ARNm {Munro T, 2006 #149}. Cependant, cette séquence n'est pas en accord avec les IMP-RRE soumises par d'autres groupes scientifiques. En effet, dans le cas de l'interaction de ZBP-1 (IMP-1) avec l'ARNm de la β -actine, les domaines KH3 et KH4 reconnaissent une séquence ACACCC comprise dans le domaine « zipcode » de l'ARNm de la β -actine (Chao Jeffrey, 2010). Tuschl et ses collègues ont donc identifié une séquence supplémentaire qu'ils considèrent pour leur part comme étant un IMP-RRE. Cette séquence est constituée de la séquence suivante CAUH où H pourrait correspondre aux nucléotides suivants : adénine, cytosine ou encore uracile. De plus, il a été retrouvé dans 30% de ces transcrits, la même séquence distante de trois à cinq de nucléotides de la première. Nous avons analysé précisément les séquences des ARNs que nous avons validé comme cibles directes d'IMP-2 ainsi que les séquences liées par les IMPs dans les cibles déjà connues comme l'ARN non codant *H19* ou le transcrit *igf-II*. Nous avons trouvé cette séquence « consensus » présente dans l'exon 5 de *H19*, le 5'UTR d'*igf-II*, le 3'UTR de *pinch-2* ou encore le 5'UTR de *murf-3* (**figure 29**). Néanmoins, la proposition de cette séquence CAUH comme IMP-RRE unique, nécessaire et suffisant, peut laisser dubitatif. En effet, la longueur de cette séquence est très petite, suggérant qu'elle peut statistiquement se retrouver fréquemment dans les transcrits et ce indépendamment de la liaison d'IMP.

DISCUSSION

Séquence du 3'UTR de l'ARNm *pinch-2*

aggctctggccgctggcctgcctgcagtaccttagcactcatc^{catc}cccctgccccaggctctgctagccactcccacttctgtccag
cccagcccgttctccgggtatgc^{catc}ctttctgettccagtccactcgggctatgtagcccttctctgtgtgagggctgaccacct
cacagg^{catt}tctctccgggcccacaacctccaggagacaggaacaaactggagcaggattattgtcacttgcctgacccgcagatcc
caaccgatgcctctctctccactctcccaggagagttcagccctcgtgtgacccttgggcttggctgagaagctgtccaaccccag
ggccagcaccacgcagatagaggcttcatggaagcacccttctcagttatcgagcacagtaggtccttgcttacactgtgtcagcaa
accacctctgggggtgaagcagcccagagccctactgccttactactcaggagacct^{cata}gaaagtgtctcagctgccaccaag
tgtgggggtcccacttcccaggggca^{catt}gcctggc^{catc}gaagaccacaagtgggtcac^{cata}cttacacaatgaaggct^{catt}ca^c
^{ata}c

Figure 29. Séquences nucléotidiques des cibles ARNs d'IMP-2.

La séquence consensus proposée est colorée de différentes couleurs : le jaune pour « catt », le bleu pour « cata » et le vert pour « catc ». Les séquences analysées de l'exon 5 *H19* et du 5'UTR *igf-II* sont d'origine humaine et les séquences du 3'UTR de *pinch-2* et du 5'UTR de *murf-3* sont celles présentes chez la souris.

DISCUSSION

Les IMPs interagissent avec de nombreux de transcrits qui sont impliqués dans différents processus biologiques, le IMP-RRE n'est pas encore identifié de façon univoque. Qu'est ce qui pourrait alors expliquer des différences aussi importantes au sein des séquences proposées ? On peut imaginer que les IMPs vont reconnaître plusieurs séquences qui sont spécifiques de mécanismes distincts : une séquence A présente dans des ARNs dont leurs fonctions est associée à un processus particulier comme l'adhésion cellulaire, une séquence B présente dans les ARNs qui codent des protéines du cytosquelette ou qui présentent des fonctions en relation avec le cytosquelette.

La reconnaissance des cibles ARNs des IMPs pourrait également dépendre d'autres caractéristiques. Le transcrit lui-même et plus particulièrement sa structure plus que sa séquence pourrait faire partie des variables les plus déterminantes quant à la reconnaissance et l'interaction avec les IMPs. Des études de cristallographie ont été réalisées dans le cas de l'interaction entre la protéine ZBP-1 et l'ARNm *β -actine*. Elles ont montré que lors de cette interaction ZBP-1 induisait une structure en « boucle » de l'ARN de la *β -actine* qui favoriserait l'assemblage de complexes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de cet ARN (Chao Jeffrey, 2010). La structure des ARNs est difficile à définir comme un critère d'identification pour les cibles des IMPs. En effet, bien qu'il existe des logiciels de modélisations et de prédictions de la structure tridimensionnelle des ARNs, ces logiciels dépendent de nombreux paramètres difficiles à déterminer au sein de la cellule. Ainsi les limites de ces modélisations ne permettent pas de déterminer des structures « type » reconnues par IMP-2 comme critère d'identification précis des cibles.

L'analyse transcriptomique des transcrits présents dans les granules IMP-2 a permis d'identifier les transcrits présents dans les complexes IMP-2. Ces transcrits enrichis dans les granules codent des protéines qui ont des fonctions associées à la synthèse des protéines, à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique, au cycle cellulaire ainsi qu'à l'adhésion cellulaire et au remodelage du cytosquelette. Un même travail a précédemment été réalisé dans le cadre d'IMP-1 dans les cellules humaines embryonnaires du rein 293 (HEK293). Les ARNm qui ont été détectés, sont liés à des fonctions communes aux ARN retrouvés dans les complexes IMP-2 : l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique ainsi qu'au cytosquelette (Johnson L, 2007).

L'analyse protéomique des granules IMP-2 a révélé que les partenaires d'IMP-2 les plus abondants appartiennent à la famille des hnRNPs. Mais d'un point de vue stochiométrique la majorité des composants de ces granules font partie des tubulines et des protéines des sous-unités ribosomiques 40S et 60S. Il se pourrait qu'une bonne partie des protéines hnRNPs

DISCUSSION

identifiées soit des contaminants et ait été immuno-précipité en raison de leur capacité à se lier aux ARNs. Il n'est cependant pas à exclure que certaines de ces protéines hnRNPs puissent être de réels partenaires protéiques d'IMP-2 et assistent IMP-2 dans des fonctions attachées aux métabolismes de l'ARN. En effet, les protéines hnRNPs sont impliquées à la fois dans la stabilisation de l'ARN mais aussi dans la régulation de l'épissage de certains messagers (Loflin P, 1999). Toutefois, la présence de ces protéines pourrait être justifiée par la présence d'IMP-1 dans les complexes IMP-2. En effet, il a déjà été montré que certaines de ces protéines comme hnRNP Q ont été identifiées dans les complexes IMP-1 dans les cellules HEK293 (Johnson L, 2007).

La présence de facteurs d'élongation de la traduction comme EEF1a et EEF1a-2, des sous-unités ribosomales 40S et 60S ainsi que de protéines impliquées dans la régulation de la traduction comme hnRNP-A ou hnRNP-C suggère l'idée d'un état traductionnellement actif de certains ARNm contenus dans une partie de complexes IMP-2. Cependant la détection de facteurs d'épissage comme hnRNP M, H1, K et F suggère également l'existence de granules IMP-2 où les ARNs seraient empaquetés dans un état non soumis à la traduction. Ces résultats permettent de proposer l'existence de plusieurs sous complexes IMP-2, caractérisés par différentes fonctions et différents contenus.

L'examen minutieux de certaines cibles ARNs d'IMP-2 par gradient de sucrose a permis de montrer qu'elles présentent une localisation subcellulaire différente. Le messager *igf-II* se retrouve dans un état traductionnel actif alors que l'ARN *H19* se retrouve dans la fraction monosomale (Boudoukha S, 2010). En outre, on remarque que ces ARNs sont détectés dans des complexes IMP-2 de poids moléculaires variés : *igf-II* est décelé dans des complexes IMP-2 de haut poids moléculaire alors que le transcrite *pinch-2* est repéré dans des complexes de petits poids moléculaires. Cette idée de sous-complexe est étayée par le fait que dans les cellules IMP-2 KD, certains partenaires protéiques d'IMP-2 affichent des régulations différentes (« up ou down régulation) des ARNs *murf-3* et *pinch-2*. Nos données montrent que parmi les partenaires protéiques d'IMP-2, l'inhibition des protéines HuR et MOV10 entraîne une augmentation de l'expression de *pinch-2* suivi d'un défaut de motilité et que les inhibitions d'Hspa9 et d'Hspa8 engendrent une diminution de l'expression de *murf-3* et de la motilité des cellules (Boudoukha S, 2010). L'ensemble de nos résultats, nous a permis de conclure ainsi à l'existence de plusieurs sous-complexes IMP-2 dont les partenaires protéiques vont définir la régulation et le devenir des ARNs cibles d'IMP-2.

DISCUSSION

III. Les ARNm *murf-3* et *pinch-2* sont régulés par IMP-2

Parmi les nouvelles cibles ARNm d'IMP-2 identifiées dans cette étude, je me suis concentré sur *pinch-2*, un gène qui code une protéine impliquée dans le remodelage des adhésions focales et *murf-3*, un gène indispensable à la stabilisation des MTs dans les myoblastes. Ces deux transcrits sont soumis à des régulations post-transcriptionnelles différentes. L'expression de *murf-3* nécessite la présence d'IMP-2 alors que l'expression de *pinch-2* est diminuée en présence d'IMP-2. À la fois la diminution de *murf3* et l'augmentation de *pinch-2*, contribuent aux différents phénotypes observés dans les myoblastes déplétés en IMP-2. Parmi ceux-ci, j'ai caractérisé dans les cellules C2C12 une diminution de la motilité de ces myoblastes, un faible niveau de la forme dé-tyrosinée de tubuline et d'une modification frappante de la morphologie de ces cellules. Ces données nous ont permis dans un premier temps d'attribuer à IMP-2 un rôle de régulateur important de la motilité cellulaire. Des études précédentes nous ont permises aussi d'appuyer nos conclusions quant au rôle d'IMP-2. En effet, il a été montré qu'IMP-1 et IMP-3 étaient impliqués dans la régulation de la stabilité de l'ARNm *CD44* et que cette régulation était nécessaire à la fois à l'adhésion cellulaire, l'étalement cellulaire ainsi qu'à la formation d'invadopodia (excroissances de la membrane plasmique des cellules tumorales qui favorisent le caractère invasif de celles-ci) (Vikesaa J, 2006).

Dans un deuxième temps, cette régulation différentielle des cibles d'IMP-2 pose la question de l'existence de plusieurs sous-complexes IMP-2. On peut imaginer que c'est la présence de différents partenaires protéiques dans les complexes qui vont déterminer le devenir des cibles d'IMP-2 et ainsi influencer sur la régulation post-transcriptionnelle induite par IMP-2. Bien que nous ayons pu montrer l'existence d'interaction directe d'IMP-2 avec les transcrits *murf-3* et *pinch-2*, nous n'avons pour le moment aucune indication sur le mécanisme précis de régulation post-transcriptionnelle commandée par IMP-2.

Par exemple dans le cas de la régulation du messenger *murf-3* par IMP-2, la présence de hnRNP D/AUF-1 pourrait seconder IMP-2 dans la régulation de la stabilité du transcrit *murf-3* au niveau de la région 3'UTR. Nous avons montré qu'IMP-2 interagissait avec le messenger *murf-3* aussi au niveau de sa région 5'UTR. Une autre possibilité serait qu'IMP-2 interagisse avec la protéine hnRNP C1 joue un rôle dans l'initiation de la traduction dépendante de l'IRES du messenger *murf-3*, comme cela a été montré dans le cas de l'ARN de l'hépatite C où IMP-1 favorise sa traduction via son interaction avec les régions 5' et 3'UTR (Weinlich, 2009).

DISCUSSION

Il serait donc intéressant d'analyser l'implication d'IMP-2 et des protéines pré-citées dans la traduction du transcrit *murf-3*.

III. Possible coopération entre IMP-2 et let-7 pour la régulation de pinch-2 ?

Les résultats non encore publiés nous ont permis d'affiner nos connaissances sur la régulation post-transcriptionnelle de *pinch-2* par IMP-2. En effet, nous avons montré qu'il existait une régulation du messenger *pinch-2* au niveau de sa région 3'UTR à la fois par IMP-2 mais aussi par le miARN let-7. De manière intéressante, de nombreux travaux ont démontré l'importance fonctionnelle d'interactions entre les miARNs et les protéines de liaisons à l'ARN (pour revue (Kedde M, 2008)). Il devient de plus en plus clair que l'activité des miRNAs ne dépend pas uniquement de leur niveau d'expression mais que celle-ci peut être influencée par les protéines de liaison à l'ARN. Il a été montré par exemple que dans le cas de la protéine HuR, celle-ci s'associe à la région 3'UTR de l'ARNm de *CAT1* après un stress et que cette interaction contrecarre l'effet de miR-122 (Bhattacharyya SN, 2006) mais aussi que la protéine HuR était impliquée dans le recrutement de let-7 pour réprimer l'expression de *c-myc* (Kim HH, 2009). L'expression de la protéine Dead end (Dnd1) empêche la fonction de plusieurs miRNAs notamment en bloquant l'accès à leurs cibles ARNs (Kedde M, 2007). De plus, il a été mis en évidence que la protéine CRD-BP (IMP-1) protège la région codante de l'ARNm β -*TrCPI* de la dégradation par le miR-183 (Elcheva I, 2009). Toutes ces données appuient le concept selon lequel les régions 3'UTR constituent des plateformes de modulation de l'expression des gènes. J'ai ainsi observé que les sites de fixation d'IMP2 sur l'UTR 3' sont proches des séquences seed pour let-7. L'ensemble de nos observations nous autorisent donc à penser qu'il existe une collaboration entre IMP-2 et let-7 dans la régulation post-transcriptionnelle de *pinch-2*.

D'un point de vue « moléculaire », l'ensemble de mes résultats indique une régulation de l'expression de *pinch-2* qui fait intervenir à la fois IMP-2 et let-7 et ces deux acteurs semblent agir ensemble dans une même voie de régulation. Ainsi nous nous permettons de proposer le modèle suivant : IMP-2 réprime l'expression de *pinch-2* en recrutant le miRNA let-7 au niveau de la région 3'UTR. En effet, IMP-2 pourrait faciliter le recrutement à un niveau proche de son site d'interaction le complexe RISC chargé de let-7 et ce complexe macromoléculaire va ensuite induire la répression de l'expression de *pinch-2*.

DISCUSSION

D'un point de vue « cellulaire », nos données proposent que la régulation de l'expression de *pinch-2* par IMP-2 et let-7 contrôle la motilité des myoblastes murins. Les adhésions focales constituent des structures très dynamiques qui sont soumises à des processus d'assemblage/désassemblage et qui sont importantes lors de la migration des cellules. En effet, lors de la migration, la composition et la morphologie des adhésions focales changent c'est pourquoi il est particulièrement avantageux pour la cellule d'avoir une traduction localisée à cet endroit. Les miRNAs interviennent dans la stabilité de leurs cibles au niveau de l'ARNm, mais ils peuvent également agir comme répresseurs traductionnels. Contrairement au clivage ou à la dégradation de l'ARNm qui est un mécanisme irréversible, la régulation de la traduction offre la possibilité de « réactiver » les transcrits. Dans notre système, on peut supposer qu'une telle réactivité peut ainsi inciter la cellule à faire appel à la régulation de *pinch-2* via let-7 et IMP-2 lors du remodelage des adhésions focales, ce qui permet d'avoir une réactivation du transcrit *pinch-2* qui est plus rapide qu'une activation de *nov*o de la transcription.

Néanmoins d'autres questions restent en suspens quant à notre modèle :

- (i) la répression de l'ARNm *pinch-2* par let-7 est elle favorisée par la liaison d'IMP-2 au niveau de la région 3'UTR
- (ii) est-il possible que la liaison d'IMP-2 au niveau de la région 3'UTR modifie la conformation de l'ARNm de *pinch-2* ce qui rendrait accessible les sites d'interaction de let-7

D'autres expériences ont donc besoin d'être menées afin de valider notre modèle et ainsi montrer l'existence d'interaction entre IMP-2, let-7 et l'ARNm *pinch-2* dans le contrôle de la motilité des myoblastes murins. Ce nouveau modèle pourrait alors constituer un autre exemple de l'importance du « dialogue » entre les protéines de liaisons à l'ARN et les miRNA dans le contrôle des processus biologiques.

DISCUSSION

Modélisation & Conclusions

Modélisation & Conclusions

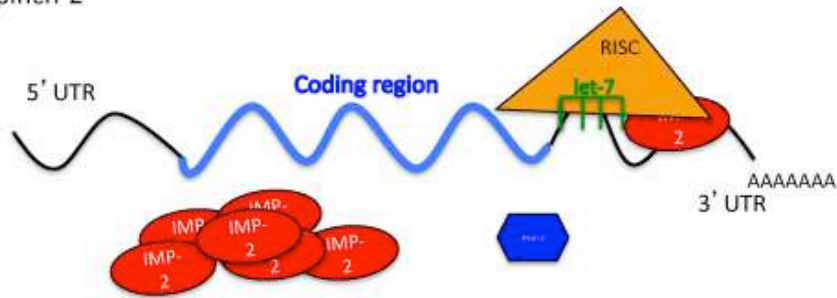
L'ensemble de mes résultats confronté à la littérature, m'a permis d'envisager plusieurs rôles pour la protéine IMP-2. En effet, nos données laissent suggérer qu'IMP-2 au sein de la cellule fait partie de divers complexes ribonucléoprotéiques qui selon la présence de certains partenaires protéiques vont déterminer le destin moléculaire particulier des ARNs cibles. Tout d'abord, IMP-2 est une protéine qui est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs ARNs notamment les messagers *murf-3* et *pinch-2*. De ces régulations, nous avons pu établir une fonction d'IMP-2 d'un point de vue global dans le contrôle de la motilité cellulaire et le remodelage des adhésions focales dans les myoblastes de souris mais aussi dans les rhabdomyosarcomes .

L'élucidation du rôle d'IMP-2 dans le cadre de la motilité cellulaire des myoblastes et des RMS constitue un très bon départ dans l'avancée des recherches qui permettront de décrypter les fonctions diverses d'IMP-2 dans un contexte physiologiquement sain comme le muscle squelettique mais aussi dans le cancer. En effet, les cibles ARNs ainsi que les partenaires protéiques d'IMP-2 restent nombreuses à caractériser. Il est donc important de replacer mon projet de thèse dans le cadre d'un projet plus général du laboratoire qui viserait à regarder simultanément l'importance d'IMP-2 et d'IMP-1 et IMP-3 dans les myoblastes et les RMS, afin de déterminer ce qui pourrait différencier ces trois membres aussi bien au niveau de leurs partenaires protéiques qu'au niveau de la régulation de leurs cibles.

Dans le cas de *pinch-2* que j'ai souhaité approfondir, j'ai démontré que la régulation post-transcriptionnelle de ce ARNm dépendait à la fois d'IMP-2 et de microRNA let-7. Ainsi, nous pouvons proposer le modèle suivant : la présence élevée d'IMP-2 pourrait faciliter l'association entre le complexe RISC chargé de let-7 avec la région 3'UTR de *pinch-2* et ainsi réduire le niveau d'expression du messager et de sa traduction. Enfin en absence d'IMP-2, le complexe RISC avec let-7 aurait très peu ou pas d'affinité pour la région 3'UTR et la traduction de *pinch-2* serait finalement augmentée (**figure 30**).

Ces axes de recherches apportent des informations différentes mais complémentaires qui doivent être analysés dans leur ensemble pour permettre de proposer de nouvelles fonctions associées à IMP-2 et à la famille IMP en général.

(A) La forte concentration d'IMP-2 favorise la liaison du complexe RISC chargé de let-7 à la région 3'UTR de pinch-2



(B) Quand l'expression d'IMP-2 est faible, le complexe RISC chargé de let-7 pourrait ne pas se fixer sur le 3'UTR de pinch-2 et la traduction de Pinch-2 est augmentée

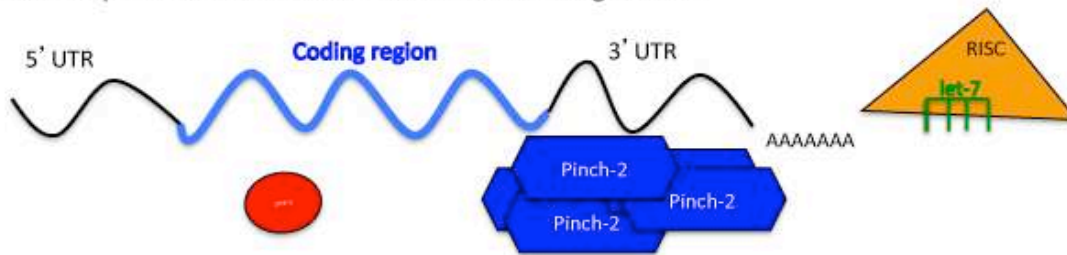


Figure 30 : Schéma représentant le modèle proposé de la régulation de l'expression de pinch-2 par IMP-2 et let-7

Figure adaptée du modèle Kim, 2009

Références Bibliographiques

- Abu-Baker A, R.G. (2007). Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochimica et Biophysica Acta 11772*, 173-185.
- Adolph SK, D.R., Nielsen FC, Christiansen J (2009). Embryonic expression of *Drosophila* IMP in the developing CNS and PNS. *Gene expression patterns 9*, 138-143.
- Alarcon VB, E.R. (2001). RNA anchoring in the vegetal cortex of the *Xenopus* oocyte. *Journal of Cell Science 114*, 1731-1741.
- Anderson C, C.H., Werner R (2006). MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acid Research 34*, 5863-5871.
- Apponi LH, L.S., Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, Pavlath GK (2010). Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Human Molecular Genetics 19*, 1058-1065.
- Ashiya M, Z.L., Grabowski PJ. (1995). Regulated splicing of gamma2 pre-messenger RNA in neuronal cells. *Nucleic Acids Symposium Series 33*, 215-216.
- Atlas R, B.L., Elliott E, Ginzburg I. (2004). The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *Journal of Neurochemistry, 89*, 613-626.
- Atlas R, B.L., Sapoznik S, Ginzburg I (2007). Dynamic association with polysomes during P19 neuronal differentiation and an untranslated-region -dependent translation regulation of the tau mRNA by the tau mRNA-associated proteins IMP-1, HuD and G3BP1. *Journal of Neuroscience Research 85*, 173-183.
- Bagga S, B.J., Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell 122*, 553-563.
- Bakheet T, M.F., Williams BR, Greer W and KS Khabar (2001). ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acid Research 29*, 246-254.
- Balagopal V, P.R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Current Opinion in Cell Biology 21*, 404-408.
- Balzer E, M.E. (2007). Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biology 4*, 16-25.
- Bandziulis RJ, S.M., Dreyfuss G. (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes & Development 3*, 431-437.
- Barreau C, P.L., Méreau A, Osborne HB (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie 88*, 515-525.
- Bartel (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanisms and function. *Cell 116*, 281-297.

- Bassell G, S.R. (1997). mRNA and cytoskeletal filaments. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 109-115.
- Beauchamp P, N.C., Hillock S, Van der Gressen K, Von Roretz C, Jasmin BJ, Gallouzi IE (2010). The clivage of HuR interferes with its transportin-2-mediated nuclear import and promotes muscle fiber formation. *Cell Death Differentiation* 17, 1588-1599.
- Becker C, D.G.B., Guyot M, Donsez E, Armand AS, Charbonnier F, Launay T, Chanoine C. (2003). Expression of MRF4 protein in adult and in regenerating muscles in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 227, 445-449.
- Bergeron C, R.-V.D., Berard-Merec P (2002). Actualités sur le rhabdomyosarcome chez l'enfant. *Bulletin du cancer* 89, 108-112.
- Bergstrom DA, P.B., Strand A, Perry RL, Rudnicki MA, Tapscott SJ. (2002). Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Molecular Cell* 9, 587-600.
- Berkes CA, T.S. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16, 585-595.
- Bhattacharyya SN, H.R., Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Birney E, K.S., Krainer AR. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research* 25, 5803-5816.
- Boudoukha S, C.S., Polesskaya A (2010). Role of the RNA-Binding protein IMP-2 in muscle cell motility. *Molecular and Cellular Biology* 30, 5710-5725.
- Boyerinas B, P.S., Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, Feig C, Xu J, Burge CB, Peter ME. (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer research* 68, 2587-2591.
- Boylan KL, M.S., li M, Marques G, Morin X, Chia W, Hays TS (2008). Motility screen identifies *Drosophila* IGF-II mRNA-binding protein-zipcode-binding protein acting in oogenesis and synaptogenesis. *PLoS Genetics* 4.
- Brants JR, A.T., Chada K, Marchal K, Van de Ven WJ, Petit MM (2004). Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Letter* 569, 277-283.
- Braun T, B.-D.G., Bober E, Tannich E, Arnold HH. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO Journal* 8, 701-709.
- Braun T, B.E., Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. (1990). Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO Journal* 9, 821-831.

- Brennan CM, S.J. (2001). HuR and mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Science* 58, 266-277.
- Brennicke A, M.A., Binder S. (1999a). RNA Editing. *FEMS Microbiology* 23, 297-316.
- Brennicke A, M.A., Binder S. (1999b). RNA editing. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 297-316.
- Briata P, C.C., Giovarelli M, Pasero M, Trabucchi M, Ramos A, Gherzi R (2011). KSRP, many functions for a single protein. *Frontiers in Bioscience* 1, 1787-1796.
- Briata P, F.S., Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Purlk PL, Guerzi R (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Molecular Cell* 20, 891-903.
- Buckanovich RJ, D.R. (1997). The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 17, 3194-3201.
- Buckingham M (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 440-448.
- Buckingham M, B.L., Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy* 202, 59-68.
- Chao Jeffrey, P.Y., Patel V, Levy Matthew, Almo Steven, Singer Robert (2010). ZBP1 recognition of b-actin zipcode induces RNA looping. *Genes & development* 24, 148-158.
- Chen JF, m.E., Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetic* 38, 228-233.
- Chen ST, J.Y., Chang CC, Chang HH, Huang MC, Juan HF, Hsu CH, Lee H, Liao YF, Lee YL, Hsu WM, Lai HS (2011). Insulin-like Growth Factor II mRNA-binding protein 3 expression predicts unfavorable prognosis in patients with neuroblastoma. *Cancer Science*.
- Choi J, C.M., Mermelstein C, Chagas S, Holtzer H, Holtzer S (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigment epithelial cells into striated, mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 7988-7992.
- Dai N, R.J., Angel M, Yanik MF, Blower MD, Avruch J (2011). mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes & development* 25, 1159-1172.
- Danckwardt S, H.M., Kulozik A (2008). 3'end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO Journal* 27, 482-498.
- Davis RL, W.H., Lassar AB. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

- Dawid IB, T.R., Taira M (1995). LIM domain proteins. *Comptes Rendus de L'Académie des Science III* 18, 295-306.
- de Hoog CL, F.L., Mann M (2004). RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117, 649-662.
- DeChaira TM, E.A., Robertson EJ (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78-80.
- Deshler JO, H.M., Abramson T, Schnapp BJ (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Current Biology* 8, 489-496.
- Dominov JA, D.J., Miller JB. (1998). Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *Journal of Cell Biology* 142, 537-544.
- Doyle GA, B.N., Leeds PF, Fleisig AJ, Prokipcak RD, Ross J (1998). The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA binding proteins. *Nucleic Acid Research* 26, 5036-5044.
- Dreyfuss G, K.V., Kataoka N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 195-205.
- Drummond MJ, M.J., Sinha M, Spratt HM, Volpi E, Esser KA, Rasmussen BB (2011). Aging and microRNA expression in human skeletal muscle: a microarray and bioinformatics analysis. *Physiological Genomics* 43, 595-603.
- Edmondson DG, O.E. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & development* 3, 628-640.
- Eilsha Z, H.L., Ringel I, Yisraelis JK (1995). Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal* 14, 5109-5114.
- El-Badry OM, M.C., Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. (1990). Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth & Differentiation* 7, 325-331.
- Elcheva I, G.S., Noubissi F and Spiegelman V (2009). CRD-BP protects the coding region of TrCP1 mRNA from miR-183 mediated degradation. *Molecular Cell* 35, 240-246.
- Eom T, A.L., Singer RH, Bassell GJ (2003). Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filipodial synapses. *Journal of Neuroscience* 23, 10433-10444.
- Evans TC, H.C. (2005). Translational control of maternal RNAs. *WormBook*.
- Ezratty EJ, P.M., Gundersen GG (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature Cell Biology* 7, 581-590.

- Ferracini R, D.R.M., Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM. (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene 10*, 739-749.
- Figuroa A, C.A., Fan J, Atasoy U, Muscat GE, Munoz-Canoves P, Gorospe M, Munoz A (2003). Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Molecular and Cellular Biology 23*, 4991-5004.
- Füchtbauer EM, W.H. (1992). MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *development dynamics 193*, 34-39.
- Gagnon JA, M.K. (2011). Molecular motors: directing traffic during localization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 46*, 229-239.
- Gallouzi IE, B.C., Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA. (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences 97*, 3073-3078.
- Ge Y, C.J. (2011). MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle 10*, 441-448.
- Gherzi R, L.K., Briata O, Wegmuller B, Moron C, Karin M and Chen CY (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA by recruiting the degradation machinery. *Molecular Cell 14*, 571-583.
- Gherzi R, T.M., Ponassi M, Gallouzi E, Rosenfeld MG, Briata P (2010). Akt-2mediated phosphorylation of Pitx2 controls CCnd1 mRNA decay during muscle differentiation. *Cell Death Differentiation 17*, 975-983.
- Glisovic T, B.J., Yong J, Dreyfuss G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letter 582*, 977-986.
- Gossett LA, K.D., Sternberg EA, Olson EN. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Molecular and Cellular Biology 9*, 5022-5033.
- Gu L, S.K., Ohama K (2004). Increased expression of IGF-II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. *International Journal of Oncology 24*, 671-678.
- Gundersen GG, B.J. (1986). Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *European Journal of Cell Biology 42*, 2 288-294.
- Gundersen GG, K.M., Bulinski JC (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and non tyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell 38*, 779-789.
- Guo K, W.J., Andrès V, Smith RC, Walsh K (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Molecular and Cellular Biology 15*, 3823-3829.
- Habig JW, D.T., Bass BL. (2007). miRNA editing--we should have inosine this coming. *Molecular Cell 25*, 792-793.

- Hafner M, L.M., Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp AM, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GR, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T (2010). Transcriptome-wide Identification of RNA-binding protein and microRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129-141.
- Hammer NA, H.T., Byskov AG, Rajpert-De Meyts E, Grondhal ML (2005). Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular Reproduction 130, 203-212.
- Hansen TV, H.N., Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, wever UM, Christiansen J and Nielsen FC (2004). Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 24, 4448-4464.
- Hark AT, s.C., Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/igf2 locus. *Nature* 405, 486-489.
- Hartley AL, B.J., Blair V, Kelsey AM, Harris M, Jones PH. (1993). Patterns of cancer in the families of children with soft sarcoma. *Cancer* 72, 923-930.
- Havin L, G.A., Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK (1998). RNA-binding protein conserved in both microtubules-and microfilament -based RNA localization. *Genes & development* 12, 1593-1598.
- Hettmer S, W.A. (2010). Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nature medicine* 16, 171-173.
- Higushi M, S.F., Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a bas-paired intron-exon structure determines position and efficiency *Cell* 75, 1361-1370
- .
- Hinman, M.a.L.H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and Molecular Life Science* 65, 3168-3181.
- Hosoi H, S.T., Hayashi Y, Inaba T, Horii Y, Morioka H, Fushiki S, Hamazaki M, Sawada T. (1992). Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines. *International Journal of Cancer* 1, 1-11.
- Hüttelmaier S, Z.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.
- Hutvagner G, S.M. (2008a). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Review Molecular and Cellular Biology* 9, 22-32.
- Hutvagner G, S.M. (2008b). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 22-32.
- Jensen KB, D.B., Stefani G, Zhong R, Buckanovich RJ, Okano HJ, Yang YY, Darnell RB. (2000). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 25, 254-256.

- Johnson JM, C.J., Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 302, 2141-2144.
- Johnson L, V.J., Krogh Anders, Nielsen K Lars, Hansen Thoma, Borup Rehannah, Johnsen Anders, Christansen jan and Nielsen C Finn (2007). Molecular composition of IMP-1 Ribonucleoprotein Granules. *Molecular and Cellular Proteomic* 6, 798-811.
- Kalebic T, T.M., Helman LJ. (1994). In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer research*.
- Kato C, M.K., Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A (2004). Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *International Journal of Cancer* 112, 365-375.
- Kawahara Y, Z.B., Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K. (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315, 1137-1140.
- Kedde M, A.R. (2008). Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle* 7, 899-903.
- Kedde M, S.M., Boldajipour B, Vrieling J, Slanchev K, Le sage C, Nagel R, Voothoeve M, Van Dijse J, Orom U, Lund A, Perrakis A, Raz E and Agami R (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273-1286.
- Keene (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5-7.
- Keene JD (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional event. *Nature Review Genetics* 8, 533-543.
- Keene JD, T.S. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Molecular Cell* 9, 1161-1167.
- Khan A, D.B., Martin L. Miller, Chris Sander, Christina S. Leslie,* and Debora S. Marks* (2009). Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nature Biotechnology* 27, 549-555.
- Khan J, B.M., Saal LH, Teichmann U, Azorsa DO, Gooden GC, Pavan WJ, Trent JM, Meltzer PS. (1999). cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13264-13269.
- Kim HH, K.Y., Srikantan S, Lee EK, Martindale JL , Gorospe M (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & development* 23, 1743-1748.
- Kim HK, L.Y., Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *Journal of Cell Biology* 174, 677-687.

- KIM VN, H.J., Siomi MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Review Molecular and Cellular Biology* 10, 126-139.
- Kim VN, H.J., Siomi MC. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 126-139.
- Kramer S, M.A., Jarrett P, Evans AE. (1983). Incidence of childhood cancer: experience of a decade in a population-based registry. *Journal of the national cancer institute* 70, 49-55.
- Krol J, L.I., Fillipowicz W (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Review Genetic* 11, 597-610.
- Krskova L, A.A., Drahokoupilova E, Sumerauer D, Mudry P, Kodet R (2011). Rhabdomyosarcoma: molecular analysis of *igf2*, *MyoD1* and *Myogenin* expression. *Neoplasia* 58, 415-423.
- Kyburz A, F.A., Langen H, Keller W. (2006). Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing. *Molecular Cell* 23, 195-205.
- Lal A, M.-M.K., Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF-1 to common labile target mRNAs. *EMBO Journal* 23, 3092-3102.
- Lapidus K, W.J., Mouneimme G, Lorenz M, Soon L, Condeelis JS, Singer RH (2007). ZBP1 enhances cell polarity and reduces chemotaxis. *Journal of Cell Science* 120, 3173-3178.
- Lassar AB, B.J., Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831.
- Lee RC, F.R., Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lemay JF, L.C., St-André O, Bachand F (2010). Crossing the borders: poly (A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biology* 7, 291-295.
- Leung KM, H.F., Lin AC, Allison R, Standart N and Holt CE (2006). Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nature Neuroscience* 9, 1247-1256.
- Li M, S.J., Weksberg R. (1997). Molecular genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Current opinion in pediatrics* 6, 623-629.
- Liao B, P.M., Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 280, 18517-18524.
- Liao B, P.M., Hu Y, Charles S, Herrick DJ, Brewer G (2004). Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 48716-48724.

- Lim LP, L.N., Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Linker K, P.A., Fechir M, Hubrich T, Greeve J, Kleinert H (2005). Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acid Research* 33, 4813-4827.
- Liu J, C.M., Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Liu JP, B.J., Perkins AS, Robertson EJ, Efstradiadis A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor (igf-1) and type IGF receptor (igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Loflin P, C.C., Shyu AB (1999). Unravelling a cytoplasmic role for hnRNP D in the vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes & development* 13, 1884-1897.
- Lunde BM, M.C., Varani G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 479-490.
- Malkin D, L.F., Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 30, 1233-1238.
- Maris C, D.C., Alain HT (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS Journal*, 2118-2131.
- Mialhe A, L.L., Treilleux I, Pelouc N, Durmontet C, Brémond A, Panh MH, Payan R, Wehland J, Margolis RL, Job D (2001). Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer research* 61, 5024-5027.
- Miller JW, U.C., Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO Journal* 19, 4439-4448.
- Miner, J.H., and B. Wold. (1990). Herculim, a fourth member of the myoD family of myogenic regulatory genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 1089-1093.
- Mootz D, H.D., Hunter CP. (2004). The STAR/Maxi-KH domain protein GLD-1 mediates a developmental switch in the translational control of *C. elegans* PAL-1. *Development* 131, 3263-3272.
- Moraes KC, Q.A.A., Maehns K, Kobarg J (2003). Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D). *Biological Chemistry* 384, 25-37.
- Mori H, S.S., Imai T, Nakamura Y, Lijima T, Suzuki A, Yuasa Y, Takeda M, Okano H (2001). Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 64, 132-143.

Mueller-Pillasch F, P.B., Wilda M, Lacher U, Beil M, Wallrapp C, Hameister H, Knochel W, Adler C, Gress TM (1999). Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. *Mechanisms of Development* 88, 95-99.

Mueller-Pillasch F, U.L., C. Wallrapp, A. Micha, F. Zimmerhackl, H. Hameister, G. Varga, H. Friess, M. Büchler, M.R. Vila, G. Adler and T. Gress, (1997). Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 14, 2729-2733.

Munroe D, J.A. (1990). Tales of poly(A): a review. *Gene* 91, 151-158.

Naguibneva I, A.-Z.M., Nonne N, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Pritchard LL, Harel-Bellan A. (2006a). An LNA-based loss-of-function assay for microRNAs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60, 633-638.

Naguibneva I, A.-Z.M., Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A (2006b). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblasts differentiation. *Nature Cell Biology* 8, 278-284.

Naidu P, L.D., TO R, Hinterberger T and Konieczny S (1995). Myogenin and MEF2 function synergically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2707-2718.

Nielsen FC, N.J., Kristensen MA, Koch G, Christiansen J (2002). Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains. *Journal of Cell Science* 115, 2087-2097.

Nielsen FC, O.L., Nielsen J, Christiansen J (1995). Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature* 377, 358-362.

Nielsen J, A.S., Rajpert-De Meyts E, Lykke-Andersen J, Koch G, Christiansen J, Nielsen FC. (2003). Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochemical Journal* 376, 383-391.

Nielsen J, C.J., Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Molecular and Cellular biology* 19, 1267-1270.

Nielsen J, N.F., Rasmus KG, Christiansen J (2000). The biphasic expression of IMP1/Vg1-RBP is conserved between vertebrates and *Drosophila*. *Mechanisms of Development* 96, 129-132.

Novitsch BG, M.G., Jacks T and Lassar AB (1996). Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *Journal of Cell Biology* 135.

Olson (1992). Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Developmental Cell* 154, 261-272.

Palazzo AF, E.C., Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 303, 836-839.

- Pappo AS, S.D., Crist WM, Maurer HM. (1995). Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology* *13*, 213-239.
- Patel GP, B.J. (2006). IMP1 interacts with poly(A)-binding protein (PABP) and the autoregulatory translational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain. *FEBS Journal* *273*, 5678-5690.
- Peled-Zehavi H, B.J., Rosbasj M, Frankel AD (2001). Recognition of RNA branch point sequences by the KH domain of splicing factor 1 in a splicing factor complex. *Molecular and Cellular Biology* *15*, 5232-5241.
- Peng SS, C.C., Xu N, Shyu AB. (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO Journal* *17*, 3461-3470.
- Polesskaya A, C.S., Naguibneva Irina, Duquet Arnaud, Moss G Eric, Harel-Bellan Annick (2007). Lin-28 binds IGF-II mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes & development* *25*.
- Polesskaya Anna, C.S., Naguibneva Irina, Duquet Arnaud, Moss G Eric, Harel-Bellan Annick (2007). Lin-28 binds IGF-II mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes & development* *25*.
- Pryor JG, B.P.P., Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Modern Pathology* *21*, 431-437.
- Reinhart BJ, S.F., Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Ceanorhabditis*. *Nature* *403*, 901-906.
- Rhodes, S.J., and S. F. Konieczny. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & development* *3*, 2050-2061.
- Rigo F, M.H. (2009). Functional coupling of last-intron splicing and 3'-end processing to transcription in vitro: the poly(A) signal couples to splicing before committing to cleavage. *Molecular and Cellular biology* *28*, 849-862.
- Ross AF, O.Y., Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and Cellular Biology* *17*, 2158-2165.
- Roush S, S.F. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology* *18*, 505-516.
- Runge S, N.F., Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J (2000). H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA binding protein. *The Journal Of Biological Chemistry* *275*, 29562-29569.
- Rybak A, F.H., Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG (2008). A feedback loop comprising lin28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature Cell Biology* *10*, 987-993.
- Salisbury E, s.K., Schoser B, Huichalaf C, schneider-Gold C, Nguyen H, Wang GL, Albrecht JH, Timchenko TL (2008). Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1

myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Experimental cell research* 314, 2266-2278.

Sastry S, B.K. (2000). Focal adhesions : a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental cell research* 261, 25-36.

Schneider JW, G.W., Zhu L, Mahdavi V, Nadal-Ginard B (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in RB-/- muscle cells. *Science* 264, 1467-1471.

Schooser B, T.L. (2010). Myotonic dystrophies 1 and 2: complexe diseases with complex mechanisms. *Current Genomics* 11, 77-90.

Scott LJ, M.K., Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU et al (2007). genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341-1354.

Scrabble H, W.D., Shimada H, Seemayer T, Sheng WW, Soukup S, Koufos A, Houghton P, Lampkin B, Cavenee W. (1989). Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1, 23-35.

Scrabble HJ, W.D., Lampkin BC, Cavenee WK. (1987). Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 329, 645-647.

Seal P, R.M. (2000). A new look at the origin, the function, and 'stem cell' status of muscle satellite cells. *Developmental biology* 218, 115-124.

Seale P, R.M. (2000). A new look at the origin, the function, and 'stem cell' status of muscle satellite cells. *Developmental biology* 218, 115-124.

Shapiro DN, S.J., Li B, Downing JR, Naeve CW. (1993). Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer research* 53, 5108-5112.

Spencer JA, E.S., Ilaria RL Jr, Richardson JA, Olson EN. (2000). Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *Journal of Cell Biology* 150, 771-784.

Stefi R, S.L., Allain FH (2005). RNA-sequence-and shape)dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Report* 6, 33-38.

Stout, A. (1946). Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles. *Annals of surgery* 123, 447-472.

Sun Q, Y.Z., G Yang, X Chen, Zhang Y, cao G, Wang J, Sun Y, Zhang P, Fan M, Shao N, Yang X (2008). Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acid Research* 36, 2690-2699.

Sundell CL, S.R. (1991). Requirements of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* 253, 1275-1277.

Tajbakhsh (2003). Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Current Opinion in Genetics & Development* 13, 413-422.

- Tajbakhsh S, R.D., Buckingham M. (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* 384, 266-270.
- Takimoto M, T.T., Matunis M, Avigan M, Krutzsch, Dreyfuss Q and Levens D (1993). Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *The Journal Of Biological Chemistry* 268, 18249-18258.
- Tapscott SJ, D.R., Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242, 405-411.
- Tessier CR, D.G., Clark BA, Pitot HC , Ross J (2004). Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer research* 64, 209-214.
- Timchenko LT, M.J., Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Lin L, Roberts R, Caskey CT, Swanson MS. (1996). Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Research* 24, 4407-4414.
- Timchenko NA, P.R., Iakova P, Cai ZJ, quan L Timchenko KL (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 13129-13139.
- Tiruchinapalli DM, O.Y., Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *journal of Neuroscience* 25.
- Tonin PN, S.H., Shimada H, Cavenee WK. (1991). Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer research* 51, 5100-5106.
- Turc-Carel C, L.-N.S., Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E. (1986). Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 3-4, 361-362.
- Vagner S, G.B., Pyronnet S (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry site. *EMBO Report* 2, 893-898.
- Valente L, N.K. (2005). ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 79, 299-338.
- Varani G, N.K. (1998). RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 27, 407-445.
- Vikesaa J, H.T., Johnson L, Borup R, Wever U, Christiansen J, Nielsen F (2006). RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO Journal* 25, 1456-1468.
- Vlasova IA, T.N., Fan D, Larsson O, Rattenbacher NB, Sternjohn JR, Vasdewani J, Karypis, Reilly CS, Bitterman PB, Bohjanene PR (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Molecular Cell* 29.

- Von Roretz C, B.P., Di Marco S, Gallouzi IE (2011). HuR and myogenesis: Being in the right place at the right time. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 1663-1667.
- Vuori, K. (1998). Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *Journal of Membrane Biology* 165, 191-199.
- Wagner M, K.S., Duerschmied D, Beil M, Adler G, Mueller F, Gress TM (2003). Transgenic overexpression of the oncofetal RNA-binding protein KOC leads to remodeling of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 124, 1901-1914.
- Wang GS, C.T. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews Genetic* 8, 749-761.
- Wang J, W.K. (1997). Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273, 359-361.
- Wang T, F.L., WATANABE Y, McNeil PD, Moulton GG, Baugur C, Fanger GR, OkadaM, Inoue Y, Persing DH, Reed SG (2003). LS523, an RNA-binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer. *British journal of cancer* 88, 887-894.
- Wang W, M.C., S Lin, H Furneaux, M Gorospe (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO Journal* 19, 2340-2350.
- Weber, C. (1854). Anatomische Untersuchung einer hypertrophische Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 7, 115.
- Weinlich, S., Huttelmaier S, Schierhorn A, Behrens S, Ostarek-Lederer A and Ostareck D (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15, 1528-1542.
- Welshhans K, B.G. (2011). Netrin-1-induced local beta-actin synthesis and growth cone guidance requires zipcode binding protein 1. *Journal of Neuroscience* 31, 9800-9813.
- Wexler L, H.L. (1997). Rhabdomyosarcom and the undifferentiated sarcomas. *Principles and practice of pediatric oncology*, 799-829.
- Wickens, N.G.a.M. (1998). Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 399-458.
- Yaffe D, S.O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-727.
- Yang DH, M.E. (2003). Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene expression patterns* 3, 719-726.
- Yang W, C.T., Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, Nishikura K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature Structural & Molecular Biology* 13, 13-21.

Yang Y, W.X., Hawkins CA, Chen K, Vaynberg J, Mao X, Tu Y, Zuo X, Wang J, Wang YX, WU C, Tjandra N, Qin J (2008). Structural basis of focal adhesion of LIM-only adaptor PINCH by integrin-linked kinase. *The Journal Of Biological Chemistry* 284, 5836-5844.

Yaniv K, F.A., Kalcheim C , Yisraelis JK (2003). The RNA-binding Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. *Development* 130.

Yisraeli, J. (2007). VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biology of the cell* 97, 87-96.

Yisraeli JK, S.S., Melton DA (1990a). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-298.

Yisraeli JK, S.S., Melton DA. (1990b). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-298.

Zhan S, S.D., Helman LJ. (1994). Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 94, 445-448.

Zhang P, W.C., Liu D, Finegold M, Harper J and Elledge S (1999). p21 and p57 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes & development* 13, 213-224.

Zhang Q, Y.K., Oberman F, Wolke U, Git A, Fromer M, Taylor WL, Meyer D, Standart N, Raz E, Yisraeli JK (1999). VG1 RBP intracellular distribution and evolutionarily conserved expression conserved expression at multiple stages during development. *Mechanisms of Development* 88, 101-106.

Zhou Z, B.A. (2001). MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 22, 311-316.

Zhou Z, L.L., Gygi SP, Reed R (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-185.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES