

2m11.2792.3

Université de Montréal

La protéine Staufen humaine peut moduler la synthèse polypeptidique

par

George Elvira

Programme de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En biochimie

Décembre, 1999

© George Elvira, 1999

Université de Montréal



E. SPTCHMS

W
4
U58
2000
V.062

1. The first section contains the title of the report.

George E. Brown

Professor of Chemistry

University of California

Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy
in the Department of Chemistry
at the University of California, San Diego

December 1962

George E. Brown

San Diego, California



Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

La protéine Staufén humaine peut moduler la synthèse polypeptidique

Présenté par :

George Elvira

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Luc DesGroseillers
Professeur. Directeur de recherche
Département de Biochimie

Docteur Léa Brakier-Gingras
Professeur. Président de jury
Département de Biochimie

Docteur Éric Cohen
Professeur. Évaluateur externe.
Département de Microbiologie

Sommaire

Le transport et la localisation de l'ARN sont des moyens remarquables de distribuer l'information génétique et de permettre à des sous-domaines intracellulaires d'établir une identité biochimique propre. Cette ségrégation des messagers génétiques est observée dans plusieurs organismes ainsi que dans plusieurs types cellulaires différents. Par exemple, la localisation d'ARNm maternels est essentielle à l'établissement de l'axe antéro-postérieur dans les ovocytes chez la drosophile et le xénope; chez la levure *S. cerevisiae*, elle est essentielle à la division asymétrique; dans les neurones, la localisation d'ARNm est essentielle à la mémoire et à l'apprentissage.

Généralement, des séquences contenues dans le 3'UTR des ARNm transportés sont nécessaires et suffisantes pour dicter leur transport. Ces séquences permettent le recrutement de protéines et forment ainsi des complexes RNP. Ces complexes migrent alors le long du cytosquelette jusqu'à la destination spécifique au transcrit, puis y sont ancrés et traduits. La caractérisation moléculaire des composantes protéiques de ces RNP devrait permettre d'en connaître plus sur le mécanisme du transport de l'ARN. Parmi les facteurs protéiques identifiés, notons des membres de la famille des protéines hnRNP chez la drosophile et le xénope, *zbp-1* (*actin zipcode-binding protein 1*) dans les fibroblastes et son homologue Vera / Vg1RBP chez le xénope, puis Staufen chez la drosophile et les mammifères.

Des études génétiques et moléculaires chez la drosophile suggèrent que Staufen soit impliquée dans le transport et la régulation de la traduction des ARNm *bicoid* et *oskar* aux pôles opposés de l'ovocyte ainsi que dans le transport de l'ARNm *prospero* durant le développement embryonnaire du système nerveux.

Afin de mieux comprendre le transport de l'ARN chez les mammifères, l'équipe du Dr DesGroseillers a entrepris le clonage et la caractérisation moléculaire de l'homologue mammifère de Staufen. Cette initiative ainsi que les résultats obtenus par d'autres équipes démontrent que la séquence primaire de l'ADNc présente une similarité de séquence avec la protéine de la drosophile : elle possède quatre domaines de séquence consensus de liaison à l'ARNdb. Chez l'humain, ces domaines sont également présents dans des protéines impliquées dans la régulation de la synthèse polypeptidique, telle que PKR. Des résultats préliminaires suggèrent que Staufen puisse s'oligomériser, ce qui pourrait être une caractéristique importante pour la formation de complexes RNP.

Dans les fibroblastes, Staufen colocalise avec des marqueurs du réticulum endoplasmique et cosédimente avec des polysomes sur un gradient de saccharose. Dans les dendrites de neurones en culture, Staufen colocalise avec des marqueurs du réticulum endoplasmique et le réseau de microtubules. De plus, des complexes RNP qui contiennent Staufen, de l'ARN poly-A, des ribosomes et des facteurs de traduction migrent, dans ces dendrites, de façon antérograde ainsi que rétrograde. Ces observations suggèrent que Staufen pourrait également être impliquée dans le transport de l'ARN chez les mammifères.

Afin de caractériser un éventuel rôle de Staufen dans la régulation de la traduction chez les mammifères, nous avons conçu une étude *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapins [RRL]. Nous avons étudié les conséquences de l'ajout de protéine recombinante Staufen sur la traduction d'ARN synthétiques. Deux types d'ARN ont été utilisés, qui codent tous deux pour le gène rapporteur CAT, mais un seul d'entre eux possède la séquence TAR du HIV-1 à son extrémité 5'. Dans les RRL, cette séquence inhibe la traduction : **(1)** par l'activation de la sérine / thréonine kinase PKR qui phosphoryle eIF2 α et inhibe alors l'initiation de la traduction; **(2)** par un accès limité de la coiffe pour les facteurs d'initiation de la traduction, ce qui cause une dissociation des polysomes et de l'ARNm et rend ce dernier propice à la dégradation par des nucléases; **(3)** par une entrave au balayage du 5'UTR habituellement effectué par le complexe d'initiation de la traduction.

L'ajout de quantités croissantes de Staufen recombinante purifiée à des RRL permet de stimuler le taux de traduction du gène rapporteur CAT dans un seul des deux cas étudiés. Pour l'ARN CAT normalement traduit l'effet ne semble pas être significatif. Cependant, l'ajout de Staufen stimule la traduction naguère réprimée de l'ARN contenant la séquence TAR. Ceci suggère que Staufen n'a pas un effet général sur la traduction, mais agit à un niveau qui est sensible à la présence de la séquence TAR. Afin de caractériser le mécanisme d'action de Staufen, nous avons généré des RRL sans activité kinase PKR par l'emploi de 10 mM de 2-aminopurine. Il est connu qu'à cette concentration de drogue, l'activité sérine / thréonine kinase PKR est inhibée. Dans de tels réticulocytes, Staufen persiste à stimuler la traduction ce qui suggère un mécanisme d'action indépendant de la voie d'inhibition de PKR. Des essais de liaison *in vitro* corrobore cette hypothèse puisqu'ils démontrent que les pré-requis structuraux de l'ARN TAR essentiels pour la liaison à PKR sont différents de ceux pour la liaison à Staufen.

Nous avons également examiné l'hypothèse de la présence d'une activité hélicase associée à Staufen. Une telle activité permettrait de désenrouler et de détruire les structures présentes en 5' des ARNm, ce qui stimulerait alors la traduction. Cependant, malgré les nombreuses conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pu détecter d'activité hélicase associée à Staufen.

Les mécanismes sous-jacents à cette stimulation de la traduction sont inconnus, mais en se basant sur le mécanisme d'inhibition de la traduction induit par la structure TAR, ainsi que les études de génétiques et de biologie cellulaire sur Staufen chez les mammifères et la drosophile, nous formulons l'hypothèse qui suit. Par sa capacité de former des complexes RNP, hStau permettrait l'une ou la combinaison des possibilités suivantes : **(1)** une association entre les facteurs de traduction et l'ARNm, facilitant ainsi l'initiation et / ou la ré-initiation de la traduction; **(2)** une stabilisation de l'ARNm induite par un accès désormais difficile pour les nucléases.

Mots clés : Staufen, traduction, RNP, ARNm, localisation.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux	x
Liste des Figures et Schémas	xi
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xv
Introduction	2
I. Le concept d'asymétrie intracellulaire	3
II. Le transport et la localisation de l'ARN	4
1. Chez la levure	4
A. <u>La conversion du type sexuel</u>	4
B. <u>Le déterminant <i>Ash1p</i></u>	6
C. <u>La localisation de l'ARNm <i>Ash1</i></u>	7
D. <u>Mécanisme de transport</u>	7
2. Chez la drosophile	10
A. <u>L'établissement de l'axe antéro-postérieur</u>	10
i. Les structures antérieures et le morphogène Bicoïd	11
1. La localisation de l'ARN <i>bcd</i>	11
2. Mécanisme de transport	12
ii. Les structures postérieures et Oskar	13
1. La localisation de l'ARNm <i>osk</i>	14
2. Les éléments en <i>cis</i>	15
3. Les facteurs en <i>trans</i>	16
B. <u>Durant le développement embryonnaire du système nerveux central</u>	18
i. La localisation de l'ARNm <i>prosp</i>	19
ii. Mécanisme de transport	19
3. Dans les dendrites	20
A. <u>L'anatomie fonctionnelle des neurones</u>	20
B. <u>La plasticité synaptique et la traduction dans les dendrites</u>	22

C.	<u>L'ARNm <i>CaMKIIα</i></u>	24
i.	Rétrospective	24
ii.	Le transport et la traduction localisée de <i>CaMKII</i>	25
D.	<u>L'ARN BC1</u>	27
i.	La régulation de l'expression	27
ii.	La localisation de BC1 / BC200	28
iii.	Contenu protéique du RNP BC1	29
E.	<u>Modèle du transport d'ARN vers les dendrites</u>	29
III. Quelques protagonistes du transport et de la localisation de l'ARN		31
1.	Les hnRNP	32
A.	<u>Rétrospective</u>	32
B.	<u>Les hnRNP et la localisation de l'ARNm</u>	33
i.	Dans les oligodendrocytes	33
ii.	Durant l'ovogenèse chez la drosophile	34
iii.	Dans l'ovocyte chez <i>Xenopus</i>	35
iv.	Les hnRNP et le transport	36
2.	Vg1RBP / Vera et zbp-1	37
3.	Staufen	41
A.	<u>Rétrospective</u>	41
B.	<u>Le domaine de liaison à l'ARNdb</u>	42
i.	Un domaine conservé dans la phylogénie	42
ii.	Un motif structural commun	42
iii.	Fonction du dsRBD	44
iv.	Affinité et spécificité de liaison à l'ARN double brin	44
C.	<u>Homologue mammifère</u>	45
IV. Un retour sur le modèle du transport et la localisation de l'ARN		49
V. La traduction chez les eucaryotes		50
1.	Survol du mécanisme d'initiation	51
2.	Le facteur d'initiation eIF2	53
3.	Influence des structures présentes en 5' de l'ARNm	54
4.	PKR module la traduction	54
A.	<u>Rétrospective</u>	55
B.	<u>Structure</u>	56
C.	<u>Mécanisme d'activation</u>	58
D.	<u>Le modèle de la dimérisation</u>	59
E.	<u>TRBP est un modulateur cellulaire de PKR</u>	59
i.	Rétrospective	60
ii.	L'association avec la TRBP module l'activité kinase de la PKR	61
5.	La structure TAR et la traduction	62

A.	<u>Une rétrospective sur le VIH-1 et le SIDA</u>	62
B.	<u>L'ARN TAR adopte un repliement hautement structuré</u>	62
C.	<u>TAR inhibe la traduction <i>in vitro</i></u>	63
D.	<u>Exemples de protéines qui lèvent l'inhibition de TAR</u>	64
i.	La protéine Tat du lentivirus VIH-1	64
1.	<u>Rétrospective</u>	64
2.	Tat et la traduction	65
ii.	L'autoantigène La	66
1.	<u>Rétrospective</u>	66
2.	<u>Structure et fonction</u>	67
3.	<u>La et la traduction</u>	68
VI.	Problématique du projet	69
VII.	Objectifs du projet de recherche de maîtrise	71
Matériels et méthodes		75
I.	Expression et purification des protéines recombinantes	75
II.	Construction de plasmides	76
III.	Synthèse d'ARNm	78
IV.	NorthWestern	79
V.	Liaison en solution	80
VI.	Traduction <i>in vitro</i>	80
VII.	Tests ELISA	81
VIII.	Essai d'activité hélicase de hStau	81
Résultats		84
I.	Purification du fragment protéique HFBDQ	84
II.	Optimisation de la réaction de traduction dans des RRL	88
III.	Dans des RRL, HFBDQ <i>trans</i>-active la traduction de messagers réprimés	91
IV.	L'effet de HFBDQ sur la traduction n'est pas le fruit d'une inhibition de l'activité catalytique de la PKR	95

VI. L'effet de HFBDQ sur la traduction n'est pas le résultat d'une activité hélicase intrinsèque	105
Discussion	110
I. Rôle potentiel de Staufen dans la traduction chez les mammifères	110
II. La protéine humaine Staufen stimule la traduction d'un ARN réprimé	111
III. Le choix de la séquence TAR comme élément de répression de la traduction	112
IV. Le choix du système des RRL	113
V. Une méthode pour obtenir de la protéine purifiée et soluble	114
VI. Un modèle d'action de la protéine HFBDQ sur la traduction	115
1. La formation de complexes RNP qui rapprocheraient l'ARNm de la machinerie de traduction	116
A. <u>Dans les RRL</u>	116
B. <u>Dans la cellule</u>	117
2. La formation de complexes RNP qui stabiliseraient l'ARN	118
Conclusion	119
A. En perspective	119

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1.	Quelques-uns des ARNm localisés dans les dendrites postsynaptiques	24
------------	--	----

Matériel et méthodes

Tableau 2.	Conditions modifiées de purification sur colonne d'affinité Ni-NTA en conditions dénaturantes	76
Tableau 3.	Oligonucléotides utilisés pour la construction de séquences TAR mutantes	78
Tableau 4.	HFBDQ présente différentes affinités de liaison pour des ARN TAR mutants	98

Liste des Figures et Schémas

Introduction

Schéma 1.	Le cycle de vie de l'ascomycète cellulaire <i>S. Cerevisiae</i>	5
Schéma 2.	Technique exploitant la fluorescence de la GFP afin d'observer indirectement le transport d'un ARN	8
Schéma 3.	Anatomie du neurone	21
Schéma 4.	Le motif de liaison à l'ARNdb	44
Schéma 5.	Représentation schématique des ADNc des homologues Stau chez la drosophile et chez les mammifères	47
Schéma 6.	Description simplifiée de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes	52
Schéma 7.	Domaines fonctionnels de la kinase PKR	57

Résultats

Figure 1.	La protéine HFBDQ recombinante purifiée est susceptible de lier de l'ARNdb en solution	85
-----------	---	----

Figure 2.	La séquence TAR réprime la traduction <i>in vitro</i> du gène rapporteur CAT	89
Figure 3.	HFBDQ stimule la traduction dans des RRL de façon dose-dépendante	93
Figure 4.	HFBDQ stimule la traduction par une voie indépendante de l'activité kinase PKR	96
Figure 5.	Le fragment protéique HFBDQ lie l'ARN TAR et cette liaison dépend de déterminants d'ARNdb	99
Figure 6.	Les pré-requis structuraux de la tige-boucle de l'ARN TAR essentiels pour la liaison à la kinase PKR ne sont pas les mêmes que pour HFBDQ	102
Figure 7.	HFBDQ ne possède pas d'activité hélicase associée	107
Annexe		
I.	Corrélation entre l'affinité pour l'ARNdb et la stimulation de la traduction.	**

Liste des abréviations

2-AP :	2-aminopurine
Å :	angström
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNdb :	acide ribonucléique double brin
ARNsb :	acide ribonucléique simple brin
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ARNr :	acide ribonucléique ribosomal
ARNt :	acide ribonucléique de transfert
ATP :	adénosine triphosphate
cpm :	coups par minutes de radioactivité
[α -P ³²] CTP :	cytosine triphosphate possédant un phosphore 32 en position α
DTT :	dithiotréitol
dsRBD :	domaine de liaison à l'ARN double brin
EDTA :	acide (éthylènedinitrilo) tétraacétique
EMSA :	essai de décalage de mobilité électrophorétique
GTP :	guanosine triphosphate
IRES :	site d'entrée interne du ribosome
kDa :	kilodalton
KCl :	chlorure de potassium
M :	molaire
β -ME :	β -mercaptoéthanol
MgCl ₂ :	dichlorure de magnésium
NaCl :	chlorure de sodium
PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
SDS :	dodécylsulfate de sodium
SRP :	particule de reconnaissance du signal
RER :	réticulum endoplasmique rugueux
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RNase :	ribonucléase
RNP :	ribonucléoprotéique
SNC :	système nerveux central

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

Tris : tris – (hydroxyméthyl) aminométhane

UTP : uracil triphosphate

[α -P³²] UTP : uracil triphosphate possédant un phosphore 32 en position α

Remerciements

Je désire avant tout remercier mon directeur de recherche, le Dr Luc DesGroseillers, qui a su m'écouter, me conseiller et m'encourager; sa direction a su catalyser la formation des bonnes synapses scientifiques en moi et aujourd'hui je lui en suis entièrement reconnaissant.

Comment rendre hommage à cet entourage qui m'a permis d'en arriver là, sans oubli, sans exagération? Une approche du style Confession, à la Musset ou à la Rousseau? Je n'en ai pas les prétentions littéraires. Quant à une liste exhaustive de noms suivis de qualificatifs abstraits et généraux cela serait – ô grand ciel! – atténuer l'importance de ces gens.

Je tâcherai donc de faire un témoignage sincère, sans ordre d'importance, comme on se doit de danser une valse, sans toutefois – enfin je l'espère – sombrer dans l'idylle post-rédaction, de ce que furent ces deux années de stage de maîtrise.

Au premier temps de la valse, mes parents, sans qui je ne serais et n'aurais rien. Par la suite, ma famille et mes amis grâce auxquels je suis heureux et souhaite le bonheur à tous mes semblables, je leur dis merci. À Stéphanie, la dame de ma vie, un sentiment inexprimable, que seule toi peut comprendre, m'étreint à l'idée de tenter la traduction en symboles typographiques de ce que tu es pour moi et de ce que tu as contribué pour la réalisation de ce mémoire, aussi ne le tenterai-je pas, *solo quiero que sepas que eres mi reina y que te agradezco por tu ayuda y tu compañía que han cambiado mi vida.*

À l'équipe de recherche, qui bat la mesure, avec laquelle j'ai intensément travaillé, nuit et jour, partagé joies, peines, Charles Aznavour, CJPX, catastrophiques dépressions, les multiples solutions à la recherche du MMS, crises de boulimie, Jacques Brel, attaques apocalyptiques anti-Micro\$oft, exubérances devant une tache

noire sur un film gris, Bob Marley, la glorieuse musique folklorique de la RDM, et j'en passe; mes meilleurs vœux. Louise, Isabelle, Annie, Sylvain, Gandalf-Lee, Marie-Ève, Mélanie « ben là », « Sexy Nade » alias Nadia, Luc dit Louis de Furax, merci de vos précieux conseils, votre amitié, vos blagues et tranches de vies palpitantes, vos reproches constructifs et confidences (jamais trois fois... ☺) dramatiques.

À Ming Luo : *Mr Ming, you are a fantastic scientist, colleague and mandarin teacher, thank you very much for those delightful encouragements as you always insisted on qualifying your colleague's work as being overwhelming and perfect... Xie xie sifu Ming!*

À Thomas, merci pour ton amitié, tes conseils, ta critique scientifique constructive, tes encouragements et ton intensité exemplaire à décortiquer les méandres du mystère de la vie. Au grand Jacques, merci pour ton humour, tes sages paroles, ton habilité désormais célèbre près des congélateurs ☺, ton amitié, ta barbe hirsute, ta confiance ainsi que ton vocabulaire riche d'expression du midi... À Demian, *gracias por tu amistad loco*, grâce à ton impeccable et contagieux sens de l'humour tu as su transformer mon quotidien et de cela je t'en suis reconnaissant.

Un remerciement extraordinaire va à la merveilleuse Annabelle pour m'avoir aidé, soutenu et pour s'être dévouée à la tâche ardue de corriger les fautes d'orthographe ainsi que de grammaire du présent mémoire. Merci au Dr Andrew Mouland pour sa générosité et pour avoir partagé ses idées sur cette étude sans lesquelles je n'aurais probablement pas été confiant de pouvoir en surmonter les difficultés techniques.

Enfin merci aux membres du jury d'investir de leur temps pour la correction de ce mémoire.

*Je dédie cet ouvrage à mes parents,
Jose et Celina qui m'ont insufflé
l'amour du savoir et de mes
semblables*

INTRODUCTION

Introduction

La ségrégation de l'ARN est un moyen élégant et attrayant de distribuer l'information génétique en créant une mosaïque de sous-domaines intracellulaires fonctionnellement distincts. Bien que les recherches portant sur ce sujet en soient encore à leurs balbutiements, plusieurs études dévoilent des exemples remarquables de ségrégation d'ARN dans des organismes divers (pour des revues : Gottlieb, 1990; St Johnston, 1995; Bashirullah et al., 1998; Kiebler et DesGroseillers, 2000). Parmi ceux-ci, notons entre autre : *bicoïd* et *oskar* lors de l'établissement de l'axe antéro-postérieur durant l'embryogenèse chez la drosophile (Driever et al., 1988; Ephrussi et al., 1991), *ash1* lors du bourgeonnement chez la levure (Bertrand et al., 1998), *Vgl* et *fatvg* lors de l'embryogenèse chez *Xenopus* (Deshler et al., 1997; Chang et al., 1999), β -*actine* dans les fibroblastes d'embryons aviaires (Kislauskis et al., 1997; Lawrence et Singer, 1986), *mbp* dans les oligodendrocytes de mammifères (Holmes et al., 1988) ainsi que plusieurs autres ARNm dans les neurones (pour une revue : Kuhl et Skehel, 1998). Le transport de l'ARN est un processus de contrôle de l'expression génique à considérer au même point que la polyadénylation, l'épissage, la stabilité ainsi que la traduction. La localisation de l'ARN pourrait aussi avoir une influence sur les processus qui affectent un transcrit durant son existence (Gottlieb, 1992).

Étant donné qu'une revue exhaustive de ce propos n'est pas le but de ce mémoire, seuls quelques exemples de ségrégation d'ARN dans des organismes différents seront retenus : chez la levure, chez la drosophile et dans les dendrites de mammifères. Par la suite, sera offert un survol de quelques protéines impliquées dans le mécanisme de ségrégation de l'ARN. Le lecteur pourra ainsi apprécier l'aspect universel du mécanisme du transport de l'ARN ainsi que le contrôle précis que celui-ci confère à la cellule. Un bref rappel de la régulation de la traduction chez les eucaryotes sera également proposé.

Finalement seront exposées l'approche expérimentale et la problématique sous-jacentes à l'étude biochimique qui sert pour l'écriture de ce mémoire : l'étude du rôle de Staufen dans la synthèse protéique chez les mammifères.

I. Le concept d'asymétrie intracellulaire

Un nombre croissant de données expérimentales démontrent que le répertoire protéique intracellulaire est asymétrique, ce qui génère des microdomaines fonctionnels. Dans plusieurs cas, cette mosaïque protéique s'avère essentielle pour la fonction cellulaire. Par exemple, au cours de l'embryogenèse, la ségrégation de facteurs déterminants est le mécanisme par lequel la division d'une cellule unique, l'œuf fécondé, engendre de nombreuses lignées cellulaires à fonctions diverses (FASEB j., 13, 1999). Dans les neurones des systèmes nerveux central et périphérique, l'asymétrie anatomique des cellules consistant en corps cellulaire, dendrites et axones est à la base de la fonction neuronale. Dès lors, cette asymétrie anatomique exige un mécanisme de triage précis et minutieux des constituants macromoléculaires : une redistribution permanente des macromolécules est probablement requise afin de répondre à la formation de nouvelles synapses ainsi qu'au remodelage de celles déjà existantes (pour des revues : Lasko, 1999; Mohr, 1999; Bailey et al., 1996).

L'asymétrie protéique intracellulaire peut être créée non seulement par le ciblage des protéines impliquées (Rindler et al., 1984), mais également par le transport et la traduction localisée des ARNm concernés (pour une revue : Etkin et Lipshitz, 1999).

II. Le transport et la localisation de l'ARN

Le transport, la localisation ainsi que la traduction d'ARNm dans des compartiments intracellulaires spécifiques sont des exemples de mécanismes conservés par lesquels la cellule établit une asymétrie intracellulaire (pour des revues : St Johnston, 1995; Steward, 1997; Bashirullah et al., 1998; Theurkauf et Hazelrigg, 1998; Etkin et Lipshitz, 1999; Kiebler et DesGroseillers, 2000). Dans la prochaine section sont présentés quelques exemples de transport de l'ARN, le lecteur désireux d'avoir une vue d'ensemble de ce processus est référé à la section IV.

1. Chez la levure

La traduction localisée de l'ARNm *ASH1* dans les cellules bourgeonnantes de l'ascomycète cellulaire *S. cerevisiae* lors de la reproduction asexuée est un exemple saisissant de transport de l'ARN.

A. La conversion du type sexuel

Dans la nature, les levures de type ascomycètes cellulaires à l'état diploïde cohabitent avec des levures à l'état haploïde. Les levures haploïdes font appel au bourgeonnement quand elles se reproduisent de façon asexuée; l'anaphase a lieu dans le col du bourgeon et chaque cellule hérite alors d'un chromosome complet {Schéma 1}. Elles font appel à la reproduction sexuée lorsque deux cellules de type sexuel différent fusionnent; deux types conjuguants haploïdes appelés α et **a** forment ainsi une

cellule diploïde. Ce processus est contrôlé par la sécrétion de phéromones de la part de chacun des partenaires (pour une revue : Fields, 1990).

Une caractéristique surprenante des lignées porteuses du gène *HO* est leur capacité de conversion à haute fréquence du type sexuel α vers α et vice versa. Seule les cellules ayant déjà fait appel au bourgeonnement (cellules mères) possèdent la capacité de conversion (pour des revues : Herskowitz, 1988; Nasmyth, 1993; Nasmyth et Hunt, 1993; Amon, 1996).

La modulation de la capacité de conversion du type sexuel est la résultante de la transcription asymétrique du gène *HO*. Ce gène, qui n'est exprimé que dans la cellule mère et seulement durant la phase tardive G1, code pour une endonucléase qui induit la conversion du type sexuel en créant une cassure sur les deux brins d'ADN au locus du gène *MAT*. Ainsi le pedigree de la levure est déterminé par l'expression modulée du gène *HO*.

B. Le déterminant Ash1p

Trois études génétiques classiques, menées par des équipes de recherche différentes, ont permis d'identifier un même gène susceptible de moduler l'expression asymétrique du gène *HO* (Bobola et al., 1996; Jansen et al., 1996; Sil et Herskowitz, 1996). Ce gène nommé *ASH1* [*asymmetric synthesis of HO*], possède les caractéristiques essentielles et suffisantes pour le rendre responsable de ce phénotype. Ces études génétiques ont démontré que lors d'une perte de fonction de *ASH1*, il y a gain du côté des cellules filles; elles peuvent convertir leur type sexuel et ainsi chambarder toute tentative de prédiction du pedigree (Bobola et al., 1996; Sil et Herskowitz, 1996). De plus, la surexpression dans les cellules mères du déterminant Ash1p est suffisante afin d'inhiber la capacité de conversion (Sil et Herskowitz, 1996). Enfin, l'expression de Ash1p est

restreinte à la cellule fille et corrèle avec le cycle de transcription de *HO* (Sil et Herskowitz, 1996; Bobola et al., 1996).

C. La localisation de l'ARNm *Ash1*

Des études par hybridation fluorescente et immunofluorescence *in situ* ont démontré qu'il existe une corrélation entre l'accumulation postanaphase de l'ARNm *ASH1* à l'extrémité du bourgeon et l'expression locale de *Ash1p* (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Des études génétiques démontrent que cette accumulation asymétrique de *Ash1p* dépend de cinq gènes nommés *SHE*, parmi lesquels *SHE1* code pour un homologue de *MYO4* une myosine de type V (Jansen et al., 1996), ainsi que du réseau d'actine (Takizawa et al., 1997). De plus, par hybridation fluorescente *in situ* l'ARNm *ASH1* apparaît systématiquement distribué sous forme de granules (Takizawa et al., 1997).

D. Mécanisme de transport

Une technique qui exploite la fluorescence de la GFP [*green fluorescent protein*], le génie génétique et la propriété de liaison à une séquence d'ARN spécifique de la protéine MS2 de l'enveloppe de phage a permis l'observation indirecte du transport et de la localisation de l'ARNm *ASH1* dans des levures vivantes (Bertrand et al., 1998) {Schéma 2}.

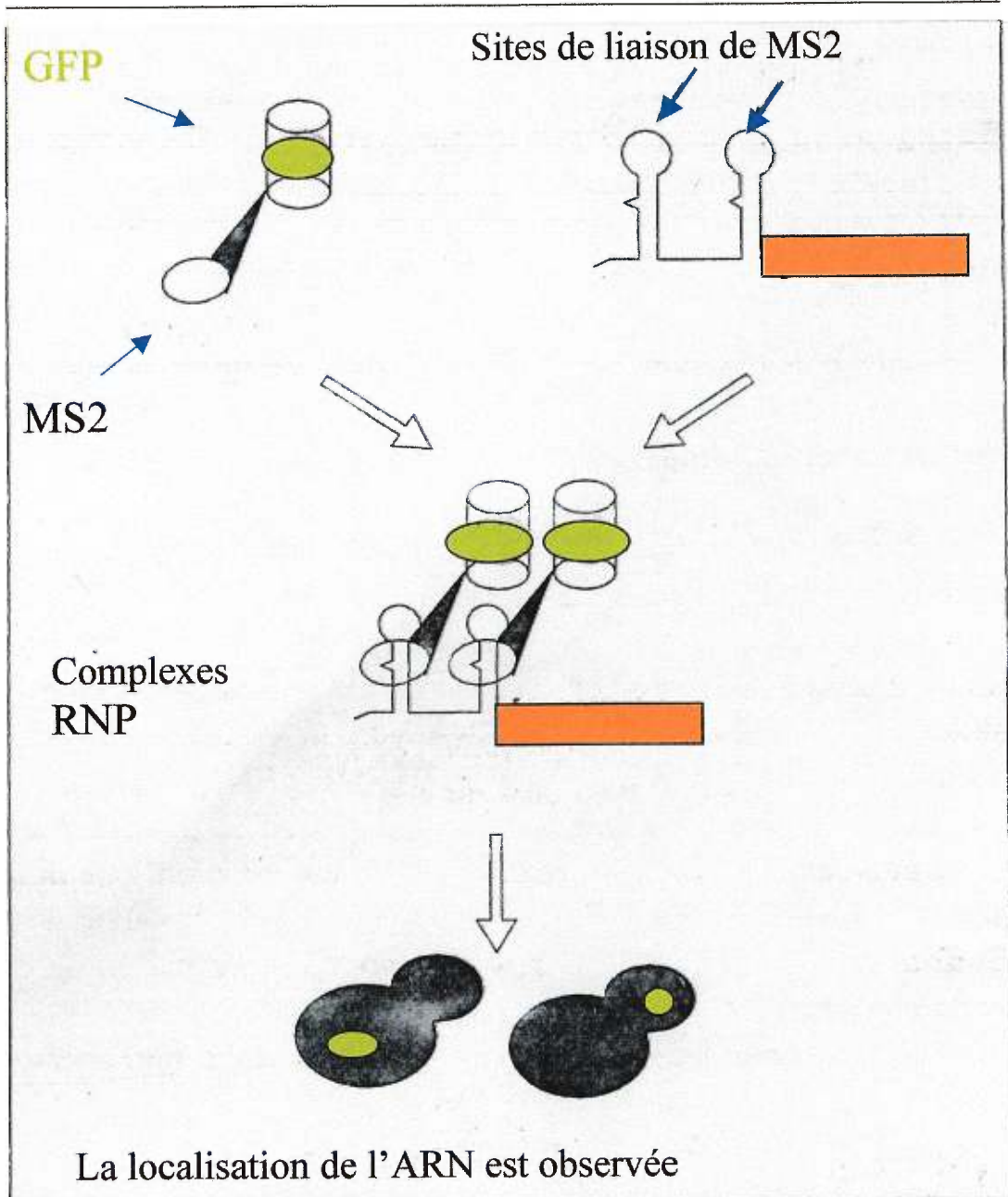


Schéma 2. La fluorescence de GFP permet d'observer indirectement le transport d'un ARN

En vert, la fluorescence de la protéine GFP permet de suivre en temps réel la localisation d'un complexe ribonucléoprotéique qui est constitué d'ARN hybride et de protéines de fusion. L'ARN hybride est constitué de la séquence d'ARN (orange) dont la localisation est étudiée, ainsi que de copies de l'élément de liaison spécifique de la protéine MS2. La protéine de fusion est constituée de la protéine MS2 couplée à GFP.

Cette brillante approche a permis d'observer en temps réel la contribution du 3'UTR de *ASH1* dans la formation de granules suivie du transport vers le bourgeon. En effet, une étude d'hybridation *in situ* précédente avait démontré que le 3'UTR de *ASH1* possédait un signal suffisant pour l'accumulation dans le bourgeon d'un ARN hétérologue (Long et al., 1997). L'approche avec la GFP a également mis en lumière la contribution des gènes *SHE* au transport de *ASH1* : She3p est essentielle à la formation de granules et She1p / Myo4p est essentielle à leur transport; ces deux protéines font partie intégrante des granules qui sont des complexes RNP (Munchow et al., 1999; Bertrand et al., 1997).

Ces expériences démontrent que le 3'UTR de *ASH1*, bien que suffisant pour la formation de ces complexes RNP et le transport, ne semble pas l'être pour l'ancrage au cortex du bourgeon : le transcrit une fois à destination continue de se déplacer. De plus, une autre étude utilisant une variante de la technique avec la GFP a démontré l'importance des gènes *BUD6 / AIP3* et *BNI1 / SHE5* pour l'ancrage de l'ARNm au cortex distal du bourgeon (Beach et al., 1999). Ces résultats suggèrent que la localisation de l'ARNm *ASH1* soit constitué d'au moins deux étapes, soient le transport et l'ancrage, notion qui est également retrouvée chez le *Xenopus* pour la localisation de l'ARNm *Vgl* lors du développement (Yisraeli et al., 1990; Sundell et Singer, 1991).

Des études de cartographie par délétion ont permis d'identifier trois éléments *cis* suffisants pour le transport du transcrit *ASH1* vers le bourgeon et de souligner l'importance de sa traduction pour l'ancrage au cortex (Gonzalez et al., 1999; Chartrand et al., 1999). Un fait frappant est que, contrairement à ce qui est généralement connu pour d'autres ARNm transportés, les signaux ordonnant le transport de *ASH1* ne sont pas restreints aux 3'UTR : deux signaux sont situés dans la séquence codante et le troisième s'étend au travers d'une petite portion en C-terminal, du codon stop et d'une portion adjacente dans le 3'UTR (Gonzalez et al., 1999; Chartrand et al., 1999). Les structures secondaires prédites [avec le logiciel MFOLD] de ces signaux ont servi de modèle

moléculaire afin d'établir une stratégie visant à identifier, par mutations ponctuelles, les éléments important à la formation des complexes RNP et au transport (Chartrand et al., 1999). Cette dernière étude suggère que le recrutement de facteurs putatifs agissant en *trans* dépende de la structure secondaire de ces éléments plutôt que de leur séquence primaire.

2. Chez la drosophile

La génétique de la drosophile est un outil très puissant qui a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. La prochaine section présente les résultats de maints efforts qui ont permis la démonstration du transport, de la localisation et de la traduction localisée des ARNm *bicoïd* et *oskar* importants dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'ovocyte ainsi que de l'ARNm *propero* important durant la neurogenèse chez la drosophile.

A. L'établissement de l'axe antéro-postérieur

Chez la drosophile, l'axe antéro-postérieur de la larve est déterminé par une expression génétique différentielle aux deux extrémités de l'œuf (Nüsslein-Volhard et al., 1987). Ces signaux différentiels sont la résultante de la traduction d'ARNm maternels localisés dans le cytoplasme à chaque extrémité de l'œuf (Frigerio et al., 1986). Le ciblage correct des ARNm maternels *oskar* [*osk*] (Lehman et Nüsslein-Volhard, 1986) et *bicoïd* [*bcd*] aux pôles opposés de l'ovocyte est essentiel à l'établissement de cet axe (pour une revue : St Johnston, 1995).

i. Les structures antérieures et le morphogène Bicoid

Chez la drosophile, le signal qui initie le développement des structures de la tête et du thorax est le produit du gène maternel *bicoid* (Driever et Nüsslein-Volhard, 1988b; Driever et al., 1990). L'ARNm de ce facteur de transcription est synthétisé dans les cellules nourricières d'ovaires, transporté dans l'ovocyte puis y est ancré au pôle antérieur via un processus constitué de multiples étapes (Berleth et al., 1988; pour une revue : Stephenson et al., 1992). Ce n'est qu'après la fécondation que l'ARNm est traduit localement et la protéine générée diffuse créant un gradient le long de l'axe antéro-postérieur (Driever et Nüsslein-Volhard, 1988a). La concentration locale du morphogène Bcd détermine l'activation de la transcription de gènes spécifiques tel que *hunchback* qui induisent alors la formation de structures antérieures (Driever et Nüsslein-Volhard, 1988b; Struhl et al., 1989). Lorsque l'ARNm du morphogène Bcd est injecté dans l'œuf en d'autres positions, il s'y forme des structures caractéristiques de la tête ainsi que du thorax (Driever et al., 1990). Ces résultats suggèrent que l'expression localisée de l'ARNm *bcd* au pôle antérieur de l'ovocyte soit essentielle à l'établissement de l'axe antéro-postérieur.

1. La localisation de l'ARN *bcd*

En exploitant la génétique de la drosophile, trois gènes essentiels à la localisation de l'ARNm *bcd* au pôle antérieur ont été identifiés : *exuperantia* [*exu*] *swallow* [*sww*] et *Staufen* [*Stau*] (Schüpbach et Wieschaus, 1986; Nüsslein-Volhard et al., 1987; St Johnston et al., 1989). L'insertion de mutations au locus respectif de ces gènes perturbe la localisation de *bcd* au cortex antérieur, mais en des temps de l'ovogenèse différents. Initialement, l'ARNm *bcd* est distribué de façon homogène dans l'ovocyte, puis Exu intervient dans sa localisation vers le pôle antérieur aux stades de d'ovogenèse 6-9 (King,

1970; St Johnston et al., 1989; Wang et Hazelrigg, 1994; Marcey et al., 1991). Subséquemment, Swallow, potentiellement en tant que composante du cytosquelette, est importante pour l'ancrage de l'ARNm *bcd* au cortex antérieur de l'ovocyte durant les stades 10B-11 (Stephenson et al., 1988; St Johnston et al., 1989; Chao et al., 1991; Hegde et Stephenson, 1993). *Staufen* n'intervient que lors du stade 12 de l'ovogenèse; son action relâche l'ARNm *bcd* du cortex antérieur et localise le transcrit dans le cytoplasme antérieur où il sera présent jusqu'à sa dégradation durant l'étape de cellularisation (St Johnston et al., 1989 et 1991).

Le clonage et la caractérisation au niveau moléculaire du gène maternel *Staufen* a démontré que la protéine elle-même est localisée aux pôles opposés de l'ovocyte et colocalise avec l'ARN *bcd* au pôle antérieur (Ferrandon et al., 1994; St Johnston, 1991). De plus, une étude de comparaison de séquence de l'ADNc *Stau* avec celle de bien d'autres protéines dans divers organismes dévoile la présence dans *Stau* de plusieurs copies d'un domaine consensus susceptible de lier de l'ARN double brin *in vitro* (St Johnston et al., 1992 et section III.3.B). Cette caractéristique laisse entrevoir la possibilité que *Stau* soit impliquée dans des interactions protéine / ARN avec l'ARNm *bcd*.

2. Mécanisme de transport

Des études de cartographie par délétion ont permis d'identifier des éléments contenus dans le 3'UTR du transcrit *bcd* qui sont essentiels et suffisants pour le transport de l'ARNm à partir des cellules nourricières vers le pôle antérieur de l'ovocyte (Macdonald et Struhl, 1988; Macdonald et al., 1993). De plus, cette localisation est sensible à l'emploi de drogues qui perturbent le réseau de microtubules (Pokrywka et Stephenson, 1991). Une étude comparative des séquences 3'UTR de *bcd* provenant de plusieurs souches de *Drosophila* suggère qu'il existe une conservation fonctionnelle ainsi

qu'une conservation des structures secondaires prédites dans la phylogénie (Macdonald, 1990; Seeger et Kaufman, 1990).

Un protocole de microinjection d'ARN dans des ovocytes de drosophile a permis de démontrer que Stau est recrutée par le 3'UTR de *bcd* et génère alors des complexes RNP (Ferrandon et al., 1994). La formation de ces complexes RNP survient au site d'injection, n'importe où qu'il soit situé, puis ils se localisent près des fuseaux mitotiques lors de la mitose suivante de façon dépendante du réseau de microtubules (Ferrandon et al., 1994). Des interactions ARN / ARN *bcd* sont essentielles à la formation de ces complexes RNP (Ferrandon et al., 1997). En effet, des séquences complémentaires intermoléculaires présentes dans les éléments essentiels à la localisation de l'ARNm permettent la formation de multimères ARN / ARN *bcd* (Ferrandon et al., 1997).

Malgré toutes ces études, les détails du mécanisme de transport restent encore inconnus. En effet, la preuve définitive que Stau interagit directement *in vivo* avec l'ARN *bcd* et / ou avec des protéines motrices qui déplaceraient les complexes RNP Stau-*bcd* le long du réseau de microtubules n'a pas encore été avancée. Cependant des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* chez *Notonecta glauca*, suggèrent qu'un homologue de Stau s'associe aux microtubules via une protéine motrice de la famille des kinésines et offre un protocole pour identifier de telles interactions dans d'autre espèces (Hurst et al., 1999).

ii. Les structures postérieures et Oskar

Des études génétiques démontrent l'importance du gène *osk* pour la formation d'une région cytoplasmique hautement structurée : le plasma du pôle postérieur (pour une revue : Rongo et Lehmann, 1993). L'ARNm *nanos* qui code pour un signal morphogénétique responsable de la segmentation correcte de l'abdomen est localisé dans le dit plasma (Lehmann et Nüsslein-Volhard, 1991; Wang et Lehmann, 1991). Des études

de dosage de gène ont permis de démontrer que *osk* est un facteur limitant qui détermine le nombre de cellules du pôle qui se forment, la quantité d'ARNm *nanos* qui y est localisée et traduite (Ephrussi et Lehmann, 1992; Smith et al., 1992; Gavis et Lehmann, 1992 et 1994). Des mutations introduites dans le gène *osk* s'avèrent dramatiques pour la formation du plasma du pôle postérieur ainsi que pour le développement de structures postérieures.

1. La localisation de l'ARNm *osk*

Des études moléculaires démontrent que la localisation de l'ARNm maternel *osk* au pôle postérieur de l'ovocyte est essentielle pour la formation du plasma du pôle postérieur (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). L'ARNm messenger *osk* est initialement transcrit dans les cellules nourricières, puis est transporté selon un mécanisme dépendant du réseau de microtubules (Pokrywka et Stephenson, 1994; Clark et al., 1994; Kim-Ha et al., 1993). Durant le stade d'ovogenèse 8, l'ARNm *osk* est partiellement concentré au pôle postérieur; au stade d'ovogenèse 9, *osk* est strictement localisé au pôle postérieur et y est traduit localement (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). Le mécanisme de localisation du transcrit implique différentes étapes : **(1)** le transport dépendant du cytosquelette et **(2)** l'ancrage stable de l'ARNm *osk* au pôle postérieur dépendant de synthèse de la longue isoforme de la protéine Oskar (Rongo et al., 1995; Markussen et al., 1995).

2. Les éléments en *cis*

Des études de cartographie par délétion et de constructions transgéniques ont permis de démontrer que le 3'UTR du transcrit *osk* possède des signaux en *cis* essentiels pour la répression spatiale de la traduction et également suffisants pour le transport dans l'ovocyte et la localisation au pôle postérieur (Rongo et al., 1995; Kim-Ha et al., 1993). Puisque la protéine Oskar dirige l'activité de *nanos*, le déterminant du pôle postérieur, la régulation spatio-temporelle de la traduction de *osk* est essentielle à sa fonction; une activité oskar non restreinte au pôle postérieur entraîne une activité délocalisée de *nanos* et l'induction de structures postérieures au détriment des structures antérieures (Ephrussi et Lehmann, 1992; Smith et al., 1992; Webster et al., 1994).

Des études ont permis d'identifier trois éléments contenus dans le 3'UTR du transcrit *osk* essentiels pour la répression de la traduction, mais qui ne sont pas impliqués dans la localisation de l'ARN au pôle postérieur (Kim-Ha et al., 1995). En effet, leur délétion entraîne l'expression précoce de la protéine Osk selon un patron de distribution qui reflète celui de l'ARNm : durant les stades d'ovogenèse 7-8, la protéine ainsi que l'ARNm sont détectables de façon homogène dans tout l'ovocyte alors que durant les stades 8-9, lorsque l'ARNm est localisé au pôle postérieur, la protéine ne devient également détectable que dans ce compartiment subcellulaire démontrant que l'ARNm peut être traduit durant tout le processus de transport (Kim-Ha et al., 1995).

La localisation du transcrit *osk* n'est cependant pas suffisante pour l'activation de la traduction de l'ARNm *osk* puisque des transcrits hétérologues sous le contrôle du 3'UTR de *osk* sont localisés, mais ne sont pas traduits (Kim-Ha et al., 1995; Rongo et al., 1995; Serano et Cohen, 1995). Des études exploitant des transgènes démontrent que l'activation de la traduction du transcrit *osk* sous le contrôle de son 3'UTR exige un élément présent en 5' du transcrit (Gunkel et al., 1998). Cet élément n'est actif qu'au pôle

postérieur et n'est fonctionnel que pour un transcrit sous le contrôle des éléments BRE ce qui suggère une fonction de dérèpresseur plutôt que d'activateur général de la traduction (Gunkel et al., 1998). La séquence en 5' du transcrit est constituée d'un 5'UTR étonnamment court [15 nucléotides] suivi d'un exon qui contient deux méthionine de départ utilisées pour la synthèse de deux isoformes de la protéine Osk (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995). Une étude plus exhaustive via la cartographie par délétion a permis d'identifier le domaine minimal contenant l'élément dérèpresseur dans la séquence comprise entre ces deux ATG.

3. Les facteurs en *trans*

Le mécanisme par lequel s'établit la régulation de la traduction de l'ARNm *osk* est controversé. En effet, dans des femelles homozygotes pour le gène *orb*, le transcrit *osk* n'est pas traduit (Kim-Ha et al., 1991; Ephrussi et al., 1991) et certains suggèrent que Orb joue un rôle au niveau de la variation de la longueur de la queue de polyadénine du transcrit (Chang et al., 1999). La protéine Orb est l'homologue de la protéine CPEB qui est importante dans l'ovocyte chez *Xenopus* pour la régulation de la traduction d'ARNm maternels masqués par une queue de polyadénine courte [section II.3.C.ii.] (pour une revue sur le masquage voir : Wickens, 1990). D'autre part, une étude récente suggère à partir de résultats obtenus dans des extraits d'ovocytes de drosophile que la régulation de la traduction de *osk* soit indépendante de variations au niveau de la queue de polyadénine ou de mécanismes de reconnaissance de la coiffe (Lie et Macdonald, 1999).

Des études moléculaires démontrent qu'une protéine de 80kDa nommée Bruno, codée par le locus *arrest* [*aret*], lie de façon spécifique les éléments responsables de la répression de la traduction du transcrit *osk* présents dans son 3'UTR et colocalise avec l'ARNm *osk* au pôle postérieur (Webster et al., 1997; Kim-Ha et al., 1995). Ces éléments

sont donc nommés BRE [*Bruno response element*] (Kim-Ha et al., 1995). D'autres études génétiques suggèrent que Bruno soit un répresseur de la traduction impliqué dans de multiples étapes du développement et soit conservé dans la phylogénie (Webster et al., 1997).

La séquence en 5' responsable de la dérèpression de la traduction est quant à elle liée spécifiquement par deux protéine nommées p68 et p50 (Gunkel et al., 1998). La protéine p50 lie également deux éléments BRE dans le 3'UTR du transcrit *osk*, et cette liaison est sensible à certaines mutations ponctuelles dans les séquences BRE qui n'interfèrent pas avec la liaison de Bruno, mais empêche la répression spatiale de la traduction du transcrit *osk* (Gunkel et al., 1998). Ceci suggère que la répression de la traduction du transcrit *osk* exige l'activité de Bruno et de p50, et suggère une interaction fonctionnelle pour la régulation de la traduction du transcrit *osk* entre ses extrémités 3' et 5' (Gunkel et al., 1998).

Des études génétiques démontrent que des mutations qui affectent la localisation du transcrit *osk* empêchent également la synthèse de la protéine Osk (Lehmann et Nüsslein-Volhard, 1988; Kim-Ha et al., 1995). De plus, des mutations au niveau de certains gènes qui perturbent le réseau de microtubules affectent la localisation de l'ARNm *osk* et perturbent l'expression de la protéine Osk (Theurkauf, 1994; Lane et Kalderon, 1994; Ruohola et al., 1991; Xu et al., 1994).

D'autre part, des mutations dans le gène *staußen* qui affectent la localisation du transcrit *osk*, mais ne perturbent pas le réseau de microtubules et maintiennent le transcrit *osk* de façon transitoire au pôle antérieur, n'affectent pas l'expression de la protéine Osk (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991; St Johnston et al., 1991). Des mouches homozygotes pour une délétion dans le gène *stau* [*Stau*^{D3}] génèrent des embryons qui ne possèdent pas de structures postérieures, même en présence d'un transgène *osk* auquel il manque les séquences régulatrices BRE (Kim-Ha et al., 1995). La mutation *Stau*^{D3}

correspond à une délétion introduite au niveau de la région qui contient le premier site accepteur d'épissage de *Stau* et empêche alors l'expression de la protéine Stau (St Johnston et al., 1991).

Cependant, le mécanisme par lequel Stau agirait sur la synthèse de protéine Osk reste inconnu. Du moins, la liaison des protéines p68 et p50 aux éléments dérèpresseurs en 5' du transcrit *osk* n'est pas affectée par la mutation *Stau^{D3}* et suggère alors une action de Stau sur la régulation de la traduction à un autre niveau (Gunkel et al., 1998).

B. Durant le développement embryonnaire du système nerveux central

Chez la drosophile, durant le développement embryonnaire du système nerveux central [SNC], se produit la division asymétrique des cellules précurseurs, appelées neuroblastes, qui génère un nouveau neuroblaste et un GMC [*ganglion mother cell*] (pour une revue : Doe et Technau, 1993). Les déterminants moléculaires sous-jacents à ces deux destinées cellulaires sont la protéine associée à la membrane Numb (Spana et al., 1995) et le facteur de transcription à homéodomaine Prospero (Doe et al., 1991; Chu-Lagraff et al., 1991), qui sont distribués exclusivement dans le GMC bourgeonnant durant la mitose (pour des revues : Campos-Ortega, 1997; Fuerstenberg et al., 1998).

La distribution intracellulaire de Prospero est régulée selon le cycle intracellulaire; durant la prophase, Prospero forme un croissant sur la membrane basale de telle sorte que lors de la mitose, la protéine se retrouve entièrement dans le GMC bourgeonnant (Spana et Doe, 1995). Cette localisation de la protéine nécessite son ancrage à la membrane par la protéine Miranda (Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1997).

i. La localisation de l'ARNm *prosp*

L'ARNm *prospero* [*prosp*] est également localisé de façon asymétrique dans les neuroblastes mitotiques : par hybridation *in situ* on peut observer la ségrégation de cet ARNm dans les GMC lors de la division cellulaire (Li et al., 1997; Broadus et al., 1998). Cette localisation de l'ARNm nécessite l'intervention de plusieurs facteurs en *trans* et dépend des microfilaments d'actine (Broadus et al., 1998). Des études génétiques ont démontré l'implication dans le transport de cet ARNm des gènes *stau*, *miranda*, *prosp* et *inscutable* (pour des revues : Doe, 1996; Fuerstenberg et al., 1998).

ii. Mécanisme de transport

Inscutable contrôle l'orientation du fuseau mitotique lors de la division asymétrique ce qui permet la localisation correcte de l'ARNm ainsi que de la protéine Prospero (Li et al., 1997; Kraut et Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996; Tio et al., 1999; Schober et al., 1999; Knoblich et al., 1999). La protéine Stau forme des complexes RNP Stau-*prosp* lors de la microinjection du 3'UTR de *prosp* dans des ovocytes, colocalise avec l'ARNm *prosp* durant l'interphase du côté apical et comigre avec cet ARNm vers le côté basal durant la prophase de façon dépendante aux microfilaments d'actine (Schuldt et al., 1998). La localisation apicale puis basale de Stau nécessite un domaine protéique compris dans sa portion en C-terminal qui peut interagir *in vivo* dans le système de double hybride chez la levure avec Miranda (Schuldt et al., 1998). Miranda, est donc impliquée dans la localisation de la protéine Prospero et des complexes RNP Stau-*prosp* via des interactions protéine / protéine (Matsuzaki et al., 1998; Schuldt et al., 1998; Shen et al., 1998).

3. Dans les dendrites

La prochaine section offre au lecteur le survol de la traduction polypeptidique dans les dendrites et son lien avec la plasticité synaptique (pour une revue : Kiebler et DesGroseillers, 2000). Une discussion sur l'importance d'une traduction dendritique dans l'établissement de la mémoire et la plasticité synaptique sera donc présentée, puis l'exemple du transport du transcrit codant pour la kinase CaMKII α ainsi que de l'ARN non codant BC1 seront examinés.

A. L'anatomie fonctionnelle des neurones

L'unité fondamentale du système nerveux est la cellule nerveuse ou neurone. Les cellules nerveuses présentent une grande diversité de dimensions et de formes; néanmoins, la plupart d'entre elles sont constituées de quatre parties : le corps cellulaire, les dendrites, l'axone et les ramifications terminales de l'axone {Schéma 3}. Les dendrites forment une série de prolongements du corps cellulaire très ramifiés et sont le site d'établissement de connections synaptiques entre les neurones.

Chaque synapse présente une mosaïque protéique spécifique aux neurotransmetteurs qui y sont relâchés. Ainsi, les neurones du SNC qui peuvent recevoir des dizaines de milliers de synapses individuelles, doivent donc créer des dizaines de milliers de microdomaines présentant les constituants moléculaires adéquats aux partenaires présynaptiques, par exemple des récepteurs associés à la membrane, des canaux ioniques spécifiques ou des facteurs impliqués dans l'induction des signaux reçus à la membrane cytoplasmique (pour des revues : Steward et Banker, 1992; Mohr et Richter, 1993; Tiedge et al., 1999; Huang, 1999).

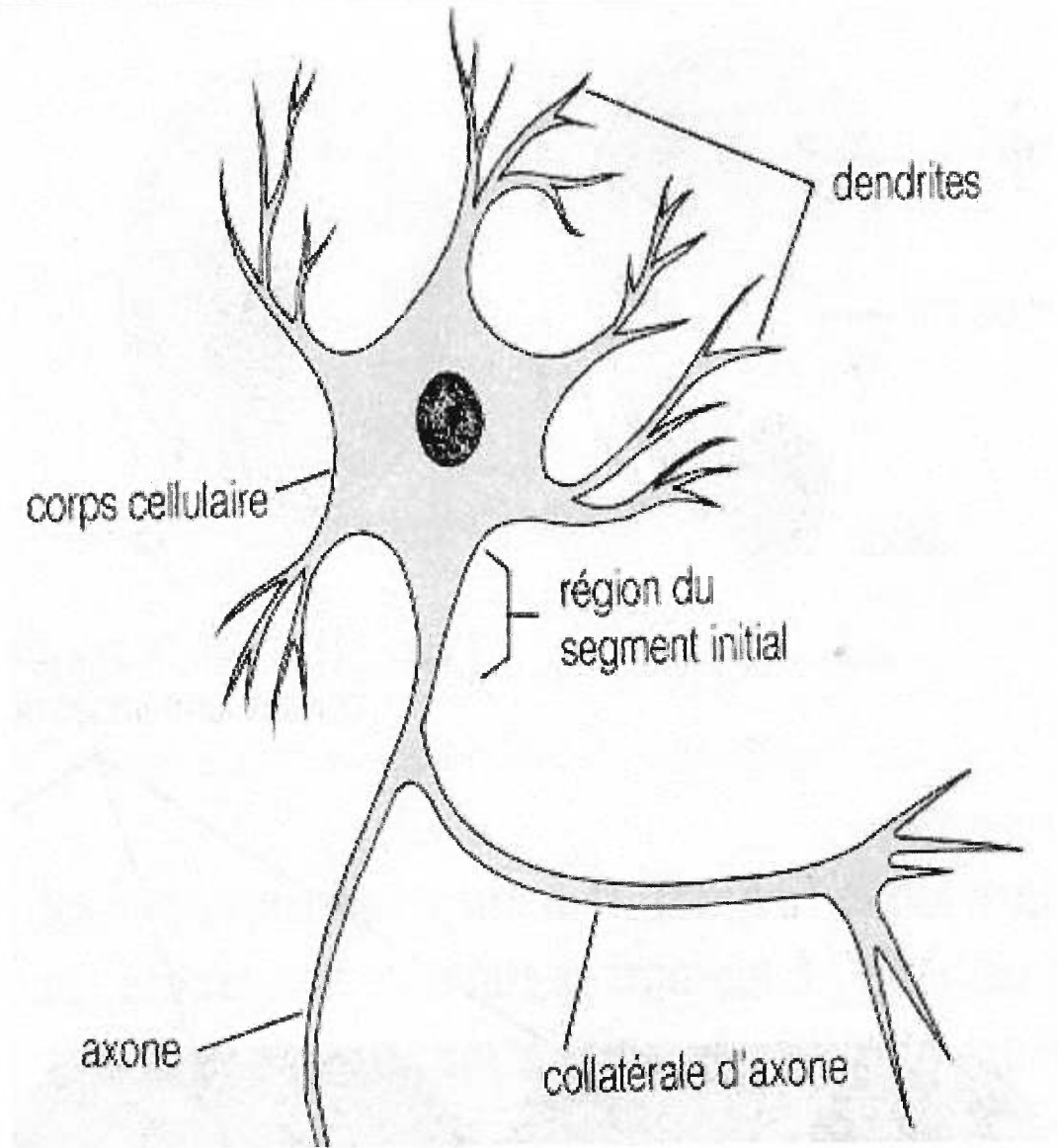


Schéma 3. Structure anatomique du neurone

B. La plasticité synaptique et la traduction dans les dendrites

En fonction de leur patron d'activité, les synapses peuvent subir des variations au niveau de la force de leur interaction (Dudek et Bear, 1992). Ces changements synaptiques, phénomène connu sous le terme de plasticité synaptique, impliquent un changement du contenu moléculaire ainsi que de la structure des synapses individuelles ou d'une population de synapses spécifiques (pour une revue : Craig et Banker, 1994). Cette plasticité synaptique contribue à de nombreux processus physiologiques ou pathologiques dans le cerveau adulte : de l'apprentissage et la mémoire à la démence et l'amnésie, de la dépendance aux drogues à l'épilepsie (pour des revues : Alberini, 1999; Bailey et al., 1996; Kiebler et DesGroseillers, 2000).

Certaines études rapportent qu'une synthèse protéique *de novo* est essentielle afin qu'un changement à long terme au niveau de la plasticité synaptique s'établisse (pour des revues : Schuman, 1997; Bailey et al., 1996). Bien que la plupart des recherches sur la plasticité synaptique se concentrent au niveau des mécanismes de régulation de la transcription des gènes (pour une revue : Cardin et Abel, 1999), quelques observations récentes suggèrent qu'une activité synaptique induit également la traduction d'ARNm dans les dendrites postsynaptiques (Steward et al., 1998; Wu et al., 1998; Kang et Schuman, 1996).

Ces excroissances cellulaires, qui sont le site d'intégration synaptique et où les changements de la force des synapses ont lieu (pour une revue : Eilers et Konnerth, 1997), sont capables d'une synthèse protéique indépendante du corps cellulaire (pour une revue : Huang, 1999). En effet, par microscopie électronique des polyribosomes peuvent être observés spécifiquement sous les jonctions synaptiques de neurones en culture (Steward et Levy, 1982; Bartlett et Banker 1984; Steward et Reeves, 1988; Chicurel et Harris, 1992), en particulier lors du développement et lors d'une synaptogenèse réactive (Torre et al.,

1993; Steward et Falk, 1986). De plus, différents types d'ARN, incluant des ARNm ainsi que des ARN non codants sont détectés par hybridation *in situ* au niveaux des dendrites (pour une revue : Kuhl et Skehel, 1998).

Les protéines codées par les transcrits dendritiques appartiennent à différentes familles {tableau 1} : notons des composantes du cytosquelette (Garner et al., 1988; Bruckenstein et al., 1990; Kleiman et al., 1990; Lyford et al., 1995), des kinases (Burgin et al., 1990) ainsi que des récepteurs (Furuichi et al., 1993; Craig et al., 1993; Racca et al., 1996). Parmi les ARN dendritiques non codants, notons des ARNr (Kleiman et al., 1993 et 1994), des ARNt (Tiedge et Brosius, 1996) et l'ARN BC1 chez le rat (Tiedge et al., 1991) ou son homologue humain BC200 (Tiedge et al., 1993). Ces ARN ainsi qu'une activité de synthèse polypeptidique ont également été détectés dans des préparations de synaptosomes de l'hippocampe, aussi connus sous la désignation de synaptodendrosomes, (Chicurel et al., 1991; Rao et Steward, 1991; Steward et al., 1991) ainsi que dans une préparation de dendrites physiquement isolées des neurones en culture de l'hippocampe (Torre et Steward, 1992).

D'autres recherches chez l'Aplysie ou bien dans des neurones en culture de l'hippocampe démontrent que des changements à long terme dans l'efficacité de la transmission synaptique comme le LTP [*long term potentiation*], la facilitation ou le LTD [*long term depression*] (pour une revue : Kim et Haganir, 1999; Bailey et al., 1996), qui servent de modèle cellulaire pour l'apprentissage et la mémoire (Malenka, 1994; Linden 1994; Nicoll et Malenka, 1995), nécessitent également une synthèse protéique synaptique (Feig et Lipton, 1993; Weiler et Greenough, 1993; Martin et al., 1997; Kang et Schuman, 1996; Casadio et al., 1999).

Tableau 1

Quelques ARNm localisés dans les dendrites de tissus nerveux variés

ARNm dendritique	Tissu	Référence
MAP2	Cortex; Hippocampe	Garner et al., 1988
CaMKII alpha	Cortex; Hippocampe	Burgin et al., 1990
Arg3.1/Arc	Cortex; Hippocampe	Lank et al., 1995; Lyford et al., 1995
L7	Cellule de Parkinje	Bian et al., 1996
dendriac (P464)	Cortex; Hippocampe	Neuner-Jehle et al., 1996; Herb et al., 1997
Récepteurs de glycine alpha 1 et 2	Modèle épinère	Racca et al., 1997
Récepteurs de glutamate	Hippocampe	Miyashiro et al., 1994
Récepteur de InsP3	Cervelet	Furuschi et al., 1993
Neurogranine/RC3	Cerveau	Landry et al., 1994
Oxytocine	Hypothalamus	Mehr et al., 1995
BC1	Hippocampe	Tiedge et al., 1991
BDNF	Hippocampe	Dugich-Djordjevic et al., 1992

Toutes ces observations soutiennent le modèle d'un transport d'ARN vers les dendrites postsynaptiques aux fins d'une traduction locale couplée à l'activité synaptique essentielle à la plasticité synaptique.

C. L'ARNm *CaMKIIα*

i. Rétrospective

Un exemple d'ARNm localisé dans les dendrites et dont la traduction locale serait importante pour la plasticité synaptique est l'ARNm codant pour la sous-unité α de la protéine kinase Ca^{2+} / calmoduline-dépendante [*CaMKIIα*]. Il s'agit d'une holoenzyme

oligomérique constitué de deux sous-unités catalytiques homologues, la sous-unité α de 50 kDa et la sous-unité β de 60 kDa (Bennett et al., 1983). Cette protéine se retrouve principalement dans les neurones du cortex (Benson et al., 1992; Sik et al., 1998; Zou et al., 1999), particulièrement dans l'hippocampe où elle représente environ 2% des protéines totales (Erondu et Kennedy, 1985). Au niveau du neurone, la kinase est abondante dans les corps cellulaires, les terminaisons de l'axone ainsi que dans les dendrites où elle y est concentrée au niveau des densités opposées aux terminaisons glutaminergiques (pour une revue : Kennedy, 1998). Plusieurs rôles sont proposés, notons : la transduction du signal, le LPT, l'apprentissage et la différenciation neuronale (Koh et al., 1999; Ouyang et al., 1997; Wu et Cline, 1998; Zou et al., 1999; pour des revues : Mayford et al., 1996a et 1996b).

ii. Le transport et la traduction localisée de *CaMKII*

Une étude avec des ARNm chimériques a démontré qu'un signal contenu dans le 3'UTR de cet ARNm est nécessaire et suffisant pour la localisation au niveau des dendrites (Mayford et al., 1996). Certaines études proposent que des séquences consensus -y et -h contenues dans le 3'UTR recrutent TB-RBP et seraient essentielles au transport de l'ARNm (Severt et al., 1999 et section II.E).

La localisation de l'ARNm *CaMKII α* au niveau des dendrites se fait de façon constitutive; aussi un rôle centrale dans la plasticité synaptique pour la protéine *CaMKII α* implique une régulation rigoureuse de la traduction du transcrit (Ouyang et al., 1999; Silva et al., 1992). Une étude récente (Wu et al., 1998) propose que cette régulation se ferait selon un mécanisme également utilisé lors du développement : la régulation de la polyadénylation cytoplasmique du transcrit.

Dans les ovocytes d'amphibiens et de mammifères, plusieurs ARNm latents sont affublés d'une courte extension de polyadénine qui dépasse rarement 30 ou 40 nucléotides. Lorsque l'ovocyte rentre en méiose ou est fécondé, ces extensions de polyadénine sont spécifiquement allongées ce qui permet alors la traduction de l'ARNm (pour une revue : Curtis et al., 1995). Dans les ovocytes, cette régulation nécessite deux signaux dans le 3'UTR des ARNm : le signal de polyadénylation nucléaire [AAUAAA] et en amont de celui-ci, le CPE [*cytoplasmic polyadenylation element* : UUUUUAU] (pour une revue : Richter, 1991). Le CPE est lié par la protéine CPEB [*CPE binding protein*] et cette interaction est essentielle pour la traduction subséquente à la polyadénylation cytoplasmique (Gebauer et al., 1996; Stebbins-Boaz et al., 1996).

Or, une étude par Wu et al. (1998) démontre par immunohistochimie, hybridation *in situ* et immunobuvardage, une expression de CPEB au niveau du cerveau; principalement au niveau des corps cellulaires et des dendrites de l'hippocampe, ainsi que dans d'autres régions. De plus, cette protéine est localisée dans les dendrites de neurones en culture et dans les densités post-synaptiques de cerveau de souris adulte (Wu et al., 1998). Cette étude démontre également que le 3'UTR de l'ARNm *CaMKII α* comporte deux éléments qui ressemblent au CPE et qui peuvent être liés par CPEB *in vitro*. Ces éléments sont fonctionnels car ils permettent la polyadénylation cytoplasmique et la traduction d'un ARNm injecté dans l'ovocyte de *Xenopus*. De plus, dans le cerveau de souris élevées en absence de lumière, des stimuli visuels entraînent la polyadénylation cytoplasmique et l'activation de la traduction de l'ARNm *CaMKII α* (Wu et al., 1998; Kirkwood et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats suggère que la traduction dendritique modulée par CPEB pourrait être importante pour la plasticité synaptique.

D. L'ARN BC1

L'ARN BC1 [*brain cytoplasmic RNA-1*] est un petit transcrit – 152 nucléotides – de l'ARN polymérase III, qui est principalement exprimé dans les neurones (Chicurel et al., 1993; McKinnon et al., 1987; Tiedge et al., 1991) et auquel on attribue un rôle dans le transport et / ou la traduction des ARNm dendritiques (Brosius et Tiedge, 1995). Dans la prochaine section le lecteur retrouvera les observations qui appuient une telle hypothèse.

i. La régulation de l'expression

Comme vu précédemment, la régulation de la traduction des ARNm dendritiques est dépendante de l'activité synaptique (section II.3.B.). Or, certains suggèrent que l'ARN BC1 soit impliqué dans l'expression des ARNm dendritiques puisqu'il subit également une régulation qui est dépendante de l'activité synaptique, condition *sine qua non* pour un tel rôle. En effet, l'inhibition de toute activité synaptique par l'emploi de drogues qui inhibent les canaux ioniques voltage-dépendants a comme effet, réversible, de diminuer dramatiquement la quantité d'ARN BC1 détectable par hybridation *in situ* (Muslimov et al. 1998). Cette même étude a démontré par hybridation *in situ* sur des neurones en culture de l'hippocampe que l'expression de l'ARN BC1 dépend du stade de développement neuronal : elle n'est détectable que lors de l'initiation de la synaptogenèse. L'ensemble de ces observations suggère que l'activité synaptique est essentielle à l'expression de BC1 dans les dendrites de neurones de l'hippocampe.

ii. La localisation de BC1 / BC200

Des études d'hybridation *in situ* sur des neurones matures de l'hippocampe en culture démontrent que l'ARN BC1 ou son homologue humain BC200 sont présents sous forme de granules dans le soma et les dendrites (Tiedge et al., 1991, 1992 et 1993; Rao et Steward, 1993). À partir de coupes de tissus, ces granules sont également détectables dans les axones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et s'accumulent dans l'hypophyse postérieure au niveau des excroissances neurosécrétrices (Tiedge et al., 1993). Ces granules sont des complexes RNP (Kobayashi et al., 1991 et 1992; Cheng et al., 1996) également visibles lors de la microinjection d'ARN BC1 synthétique dans des neurones en culture (Muslimov et al., 1997).

Une étude de cartographie par délétion a démontré que les 62 premiers nucléotides en 5' du transcrit BC1 forment un élément de signal en *cis* suffisant pour la formation de complexes RNP ainsi que pour le ciblage vers les dendrites (Muslimov et al., 1997). De plus, la position de cet élément à l'intérieur d'un ARN hétérologue n'affecte pas sa capacité de diriger le processus de localisation dans les dendrites (Muslimov et al., 1997). L'équipe d'Anzai (Nihon University, Japon) a récemment rapporté (Muramatsu et al., 1998; Kobayashi et al., 1998) que cette portion de séquence contient deux éléments consensus -y et -h (Kwon et Hecht, 1991; voir section II.3.E). Ces séquences consensus sont également présentes dans les transcrits dendritiques codant pour CaMKII α , Ligatine et les MAP2 a / b, mais absentes dans le transcrit non dendritique MAP2 c (Severt et al., 1999).

iii. Contenu protéique du RNP BC1

La caractérisation du contenu protéique des RNP BC1 / BC200 devrait permettre de caractériser le mécanisme de transport de cet ARN. Cette hypothèse de travail, plusieurs équipes de recherche l'ont acceptée et mise à l'épreuve expérimentalement. Il en sort que l'ARN BC1 / BC200 interagit *in vitro* et copurifie à partir d'extraits cellulaires avec l'autoantigène La (Kremerskothen et al., 1998a), l'hétérodimère SRP 9 / 14 (Kremerskothen et al., 1998b) qui est essentiel à l'arrêt de la traduction par la particule SRP (Bovia et al., 1996), la m-transline (TB-RBP : voir section II.3.E.) et Trax (Muramatsu et al., 1998, Kobayashi et al., 1998). Notons que pour la majorité de ces protéines, la littérature rapporte des activités qui modulent la traduction (Svitkin et al., 1994 et section V.5.D.ii.3.; Kwon et Hecht, 1991 et 1993; Bovia et al., 1996) et font de la particule RNP BC1 / BC200 un candidat à la régulation de la traduction de transcrits dendritiques.

E. Modèle du transport d'ARN vers les dendrites

Une caractéristique structurale commune aux ARNm transportés vers les dendrites de neurones de l'hippocampe est la présence d'éléments consensus -y et -h (Han et al., 1995a et b; Muramatsu et al., 1998, Kobayashi et al., 1998). Ces éléments consensus, présents dans les séquences 3'UTR des ARNm de toutes les protamines mammifères connus, induisent la formation de complexes RNP et sont essentiels à la régulation temporelle de la traduction de ces ARNm durant la spermatogenèse (Kwon et Hecht, 1991 et 1993; pour des revues : Sommerville, 1992; Sommerville et Ladomery, 1996). Les protamines sont la composante protéique nucléaire majeure des spermatozoïdes mammifères : à un stade déterminé durant la spermatogenèse elles remplacent les histones

somatiques et testiculaires entraînant l'arrêt de la transcription germinale (Balhorn et al., 1984). La régulation de la traduction de ces transcrits est donc cruciale pour la fonction de la protéine. Les éléments -y et -h recrutent la phosphoprotéine TB-RBP [*testis-brain RNA Binding Protein*] dont la liaison, sensible à l'état de phosphorylation de la protéine, réprime la traduction de l'ARNm (Kwon et Hecht, 1991 et 1993). La protéine TB-RBP est également impliquée dans le transport d'ARNm au travers de ponts intercellulaires entre les cellules germinales (Morales et al., 1998).

Dans le cerveau, TB-RBP est principalement exprimée dans les neurones (Wu et al., 1999) et forme des RNP de 11,5S avec l'ARN non codant BC1 / BC200 (Muramatsu et al., 1998; Kobayashi et al., 1998). Cette protéine est capable d'associer *in vitro* les ARNm neuronaux localisés *tau* et *mbp* via leur élément consensus -y et -h ainsi que des microtubules ce qui suggère un rôle pour TB-RBP dans le transport d'ARNm dendritiques via le réseau de microtubules (Han et al., 1995a et b). De plus, TB-RBP interagit avec l'ATPase associée de façon transitoire avec le réticulum endoplasmique, une ATPase impliquée dans le transport intracellulaire et la fusion de vésicules (Wu et al., 1999).

Les éléments -y et -h présents dans le 3'UTR des transcrits dendritiques permettent la formation de RNP qui contiennent la protéine TB-RBP (Wu et al., 1999; Severt et al., 1999). L'emploi d'oligonucléotides antisens dirigés contre le site de liaison de TB-RBP sur le 3'UTR des ARNm de CaMKII α , une protéine cytosolique, et de Ligatine, une protéine liée à la membrane, désorganise et délocalise les complexes RNP de ces ARNm (Severt et al., 1999). De plus, dans cette même étude, les auteurs observent que l'inhibition de l'expression de la chaîne lourde de la kinésine par l'emploi d'oligonucléotides antisens entraîne la délocalisation des complexes RNP contenant l'ARNm *CaMKII α* , mais non de ceux contenant l'ARNm *ligatine*.

En conclusion, un modèle du transport des ARNm vers les dendrites des neurones de l'hippocampe suggère que (1) la protéine TB-RBP, le réseau de microtubules et la

chaîne lourde des kinésines sont essentiels à la formation et la localisation de RNP d'ARNm spécifiques contenant des séquences consensus -y et-h; (2) le complexe RNP BC1 / BC200, qui contient des protéines susceptible de moduler la synthèse polypeptidique, serait impliqué dans le transport ou la régulation de la traduction des ARNm dendritique selon un patron régulé par l'activité synaptique.

III. Quelques protagonistes du transport et de la localisation de l'ARN

Un des aspects communs au processus de localisation de l'ARN est la présence, dans le 3'UTR des transcrits transportés, de signaux essentiels et suffisants pour le recrutement de protéines. Ces protéines permettent alors la formation de complexes RNP qui sont transportés le long d'éléments du cytosquelette et localisés dans des sous-domaines intracellulaires spécifiques. Quelques protéines capables de lier ces éléments en 3' et susceptibles d'être impliquées dans différents aspects du transport de l'ARNm ont été identifiées (pour des revues : Oleynikov et Singer, 1998; Arn et Macdonald, 1998; Hazelrigg, 1998). Parmi celles-ci, notons hnRNP A2 dans les oligodendrocytes (Hoek et al., 1998) et VgRBP60 (homologue de hnRNP 1) chez *Xenopus* (Cote et al., 1999), zbp-1 (*actin zipcode-binding protein 1*) dans les fibroblastes (Ross et al., 1997) et son homologue Vg1RBP / Vera chez *Xenopus* (Ross et al., 1997; Deshler et al., 1998), LP54 chez *P. lividus* (Costa, 1999), ainsi que Ex1 et Stau chez la drosophile (Macdonald et al., 1995; St Johnston et al., 1991). Pour des raisons de concision, un bref survol des protéines hnRNP, zbp-1 / Vera et Stau est présenté ci-après.

1. Les hnRNP

A. Rétrospective

Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes hnRNP, principalement caractérisées dans les cellules humaines, forment une famille d'au moins vingt membres qui s'associent avec des pré-ARNm naissants et participent aux processus de maturation des ARNm (pour des revues : Dreyfuss et al., 1993; Nakielny et al., 1997; Krecic et Swanson, 1999). Tous les transcrits semblent associés avec la plupart des protéines hnRNP, mais les stœchiométries varient; la constellation de protéines sur chacun serait unique (Piñol-Roma et al., 1989; Matunis et al., 1993).

Plusieurs protéines hnRNP, par exemple les hnRNP A1 / A2 et hnRNP K, sont principalement nucléaires, mais font la navette entre le noyau et le cytoplasme. Un motif spécifique, nommé M9, dirige ce comportement (Micheal et al., 1995; Siomi et Dreyfuss, 1995; Weighardt et al., 1995). Un modèle proposé par plusieurs auteurs suggère que le rôle principal de la plupart des hnRNP contenant le motif M9 soit de diriger l'exportation des ARNm hors du noyau (Piñol-Roma et Dreyfuss, 1992; Lee et al., 1996; Visa et al., 1996).

Des études récentes ont enrichi ce modèle. En effet, il semble que certaines protéines hnRNP sont impliquées dans le transport et la localisation cytoplasmique d'ARNm. Dans la prochaine section le lecteur retrouvera un bref aperçu des récents travaux entrepris sur ce sujet palpitant; dans les oligodendrocytes, l'ovocyte du *Xenopus* et celui de la drosophile.

B. Les hnRNP et la localisation de l'ARNm

i. Dans les oligodendrocytes

La myéline du SNC enveloppe les axones et est une extension morphologique complexe de la membrane plasmique des oligodendrocytes. Des études de fractionnement cellulaire et d'immunohistochimie ont démontré qu'une composante structurale importante de la membrane de myéline est la protéine MBP [*myelin basic protein*] (Smith, 1992). La localisation de la protéine MBP est la résultante du transport et de la traduction locale de l'ARNm *MBP* au niveau de la périphérie myélinisante des oligodendrocytes (Colman et al., 1982; Brophy et al., 1993). Initialement, l'ARNm *MBP* est retrouvé en périphérie du noyau et ce n'est que lors du déclenchement de la myélinisation que l'ARNm est transporté vers la périphérie (Trapp et al., 1987; Sorg et al., 1987).

Ce transport se fait sous forme de complexes RNP qui migrent le long du réseau de microtubules (Ainger et al., 1993; Amur-Umarjee et al., 1993). Ces complexes contiennent également l'ARNt-arginyl synthétase, le facteur d'élongation EF-1 α ainsi que de l'ARNr (Barbarese et al., 1995). Des études de délétions ont démontré qu'un signal contenu dans le 3'UTR du messenger (le RTS : *RNA trafficking signal*) est suffisant et nécessaire pour ce transport (Ainger et al., 1997).

Des études récentes ont démontré que hnRNP A2 lie spécifiquement cet élément *in vitro* et serait essentiel au transport de *mbp* (Hoek et al., 1998). De plus, ces deux composantes, l'élément RTS et la hnRNP A2, sont susceptibles d'influencer la traduction du messenger (Kwon et al., 1999).

ii. Durant l'ovogenèse chez la drosophile

Des études génétiques chez la drosophile ont démontré l'implication du gène *Squid* [*Sqd*], qui code pour la protéine hnRNP Sqd, dans l'établissement de l'axe dorso-ventral dépendant de *Gurken* [*Grk*] (Kelley et al., 1993). Le gène *grk* code pour un homologue de TGF- α [*transforming growth factor*] (Neuwman-Silberberg and Schüpbach, 1993), spécifique à la lignée germinale. Grk est le ligand du récepteur EGFR [*epidermal growth factor receptor*] qui est exprimé dans toutes les cellules somatiques du follicule qui environne la lignée germinale. L'activation de EGFR par Grk induit les cellules du follicule à adopter une destinée cellulaire dorsale, délimitant alors la polarité de l'œuf ainsi que du futur embryon. C'est pourquoi il est impératif, afin de préserver l'axe embryonnaire normal, que l'expression de Grk soit restreinte au côté dorsal de l'œuf.

Cette restriction spatiale est atteinte, en partie, par le transport et la traduction localisée de l'ARNm *Grk* (pour une revue : Nilson et Schüpbach, 1999). Les études génétiques mentionnées plus haut suggèrent que Sqd est importante dans la localisation de l'ARNm *Grk*. Afin de mieux comprendre ce processus, l'équipe de Schüpbach (Norvell et al., 1999) a entrepris l'étude du rôle de Sqd dans la localisation de l'ARNm *Grk*. Elle a démontré une interaction directe entre la protéine Sqd et le 3'UTR de l'ARNm *Grk*. Elle a observé une distribution intracellulaire différente pour les trois isoformes de Sqd obtenues par épissage alternatif : pour deux isoformes elle est nucléaire et pour l'autre elle est cytoplasmique.

Certains résultats suggèrent que le transport et la traduction du transcrit *Grk* sont conjointement régulés via l'interaction entre Sqd et la protéine Bruno, qui est un inhibiteur de la traduction pour l'ARNm *osk* (Kim-Ha et al., 1995). En effet, Bruno co-immunoprécipite à partir d'extraits cellulaires d'ovocytes avec Sqd. Cette interaction *in vivo* est corroborée par une étude de chromatographie d'affinité : Bruno traduit *in vitro* est

retenue par la fusion Sqd-GST immobilisée sur une colonne de glutathione (Norvell et al., 1999).

L'action de la protéine hnRNP Sqd n'est pas limitée à la localisation du transcrit *Grk*, en effet, une autre étude démontre que Sqd ou ses homologues humains sont essentiels pour le transport cytoplasmique le long du réseau de microtubules et la localisation des transcrits *Pair-Rule* dans l'embryon de la drosophile, démontrant la conservation fonctionnelle dans la phylogénie de cette protéine (Lall et al., 1998).

iii. Dans l'ovocyte chez *Xenopus*

Un autre exemple où des hnRNP sont impliquées dans la localisation de l'ARN est retrouvé dans l'ovocyte de l'amphibien *Xenopus laevis*. Durant l'ovogenèse, l'axe animal-végétal embryonnaire coïncide avec la localisation de certains ARNm maternels (pour une revue : Mowry et Cote, 1999). Par exemple, l'ARNm *Vg1* qui code pour une protéine membre de la famille des TGF- β est localisé, durant l'ovogenèse, dans l'hémisphère végétale de l'ovocyte (Weeks et Melton, 1987). Après la fécondation, l'expression locale de *Vg1* au niveau de l'hémisphère végétale est cruciale pour le développement embryonnaire normal.

La localisation de l'ARNm *Vg1* est dictée par une séquence de 340 nucléotides, nommé VgLE [élément de localisation de *Vg1*], présente dans le 3'UTR du transcrit (Mowry et Melton, 1992). Plusieurs études ont été entreprises afin d'identifier les éléments essentiels contenus dans cette séquence. L'une d'entre elle démontre l'importance de quatre éléments présents en de multiples copies et distribués aux extrémités de VgLE [E1 à E4] (Deshler et al., 1997). La délétion d'un ou de plusieurs de ces éléments entraîne la délocalisation du transcrit *Vg1 in vivo* (Mowry et Melton, 1992).

De plus, l'efficacité de localisation de l'ARNm *Vg1* est directement proportionnelle au nombre d'éléments E2 présents dans le transcrit (Deshler et al., 1998).

Une autre étude de cartographie souligne l'importance des séquences présentes aux extrémités 5' et 3' de l'élément VgLE pour la localisation du transcrit *Vg1* et démontre que la duplication d'un sous-élément de 85 nucléotides présent en 5' de VgLE est suffisante pour diriger cette localisation (Gautreau et al., 1997). Ce sous-élément de 85 nucléotides contient au moins une copie de chacun des éléments énoncés plus haut [E1 à E4] (Deshler et al., 1998) ainsi qu'une séquence composée de l'hexanucléotide UUUCUA et nommée VM1 [motif *Vg1* 1]. VM1 est essentielles pour la localisation du transcrit : l'introduction de mutations ponctuelles dans VM1 abolit la localisation de *Vg1* (Gautreau et al., 1997).

Une étude récente démontre qu'il existe une corrélation entre l'affinité de liaison d'une protéine de 60kDa [VgRBP60], présente dans un extrait d'ovocyte, pour la séquence VM1 *in vitro* et la localisation *in vivo* du transcrit : des mutations qui abolissent la liaison interfèrent avec le processus de localisation de l'ARNm (Cote et al., 1999). Le clonage de cette protéine dévoile qu'il s'agit d'un homologue de la protéine humaine hnRNP1. Par immunohistochimie et hybridation *in situ*, les auteurs de cette étude démontrent que la protéine colocalise avec l'ARNm *Vg1* dans le cytoplasme végétal ce qui suggère un rôle fonctionnel pour la liaison observée *in vitro* (Cote et al., 1999).

Ces résultats font de VgRBP60 une hnRNP importante pour la localisation cytoplasmique de l'ARNm *Vg1* dans l'ovocyte chez *Xenopus*.

iv. Les hnRNP et le transport

La fonction de ces molécules dans le transport et la localisation d'ARNm crée un lien sans précédent entre la transcription, l'assemblage de complexes RNP nucléaires, le

transport hors du noyau et la localisation cytoplasmique. De plus, il semble que la machinerie utilisée pour ce processus se soit conservée au cours de l'évolution et fait du transport de l'ARNm un processus de régulation critique de l'expression génique.

2. Vg1RBP / Vera et zbp-1

Dans cette section il sera question de la protéine Vg1RBP / Vera essentielle à la localisation de l'ARNm *Vg1* chez *Xenopus* (Schwartz et al., 1992 ainsi que la section précédente) et de son homologue zbp-1, une protéine essentielle à la localisation de l'ARNm β -actine dans les fibroblastes (Ross et al., 1997).

Dans l'ovocyte chez *Xenopus*, l'ARNm *Vg1* est distribué de façon uniforme dans l'ovocyte durant les stades de l'ovogenèse I / II, aux stades III / IV le transcrit est alors accumulé au niveau du cortex végétale (Melton, 1987; Weeks et Melton, 1987; Yisraeli et Melton, 1988). L'utilisation d'inhibiteur du cytosquelette a permis la démonstration d'un mécanisme de localisation constitué d'au moins deux étapes : le transport du transcrit dépendant du réseau de microtubules et une fois à destination, l'ancrage du transcrit dépendant des microfilaments d'actines (Yisraeli et al., 1990).

Le processus de localisation du transcrit *Vg1* est dirigé par des éléments contenus dans une portion de la séquence du 3'UTR nommée VgLE [voir la section précédente pour de plus amples détails] (Mowry et Melton, 1992). VgLE est capable de former des complexes RNP avec plusieurs protéines, qui sont ainsi considérées comme étant susceptibles de jouer un rôle dans la localisation du transcrit. Parmi celles-ci, notons les protéines : Vera / Vg1RBP (Schwartz et al., 1992; Deshler et al., 1998 et 1997; Havin et al., 1998), les multiples VgRBP [*Vg1 RNA binding proteins*] -78, -40, -36 et -33, et enfin la VgRBP60 / hnRNP1 (Cote et al., 1999).

Des essais de pontage aux UV avec des sondes VgLE marquées au P³² et des extraits S-100 [fraction cytoplasmique] d'ovocytes du Xénope ont démontré la liaison spécifique d'une protéine de M_r de 69kDa et nommée Vg1RBP (Schartz et al., 1992). L'analyse de préparation de microtubules à partir d'extraits d'ovocyte démontre qu'ils sont riches en Vg1RBP ainsi qu'en ARNm *Vg1* de plus, la protéine Vg1RBP est requise pour l'association de l'ARNm *Vg1* aux microtubules *in vitro* (Elisha et al., 1995). Ces résultats suggèrent que Vg1RBP permet l'association de l'ARNm *Vg1* aux microtubules, association essentielle au transport de l'ARNm (Yisraeli et al., 1990).

Une autre étude utilisant le même type de protocole de pontage aux UV a permis de démontrer cette fois là, la liaison d'une protéine de M_r de 75kDa (Deshler et al., 1997). L'étude de la séquence du VgLE [voir la section précédente] démontre l'existence de séquences présentes en multiples copies [E1 à E4] (Deshler et al., 1997). La délétion de ces séquences compromet la localisation du transcrit *Vg1* (Mowry et Melton, 1992) et la délétion de trois de ces éléments diminue dramatiquement la liaison *in vitro* de VgLE avec la protéine de 75kDa (Deshler et al., 1997). Les tentatives initiales de purification de cette protéine ont démontré qu'elle cosédimente avec un marqueur du réticulum endoplasmique (Deshler et al., 1997). Dans des ovocytes rendus au stade d'ovogenèse II, la distribution de ce marqueur [TRAP α] chevauche partiellement la distribution de l'ARNm *Vg1* : cet ARNm ne colocalise pas avec tout le réticulum endoplasmique, mais seulement avec des sous-domaines (Etkin, 1997). La colocalisation de l'ARNm, de sous domaines du réticulum endoplasmique et de la protéine de 75kDa [dorénavant nommée Vera pour : *VgLE binding and RE association*] suggère un rôle pour cet organelle dans la localisation d'ARNm.

Le clonage de ces deux protéines démontre qu'il s'agit d'une seule et même protéine, qui est dorénavant nommée Vg1RBP / Vera (Havin et al., 1998; Deshler et al., 1997). L'alignement de séquences démontre une forte homologie de séquence entre

Vg1RBP / Vera et la zbp-1, une protéine essentielle à la localisation de l'ARNm β -actine dans les fibroblastes (Ross et al., 1997).

Dans plusieurs types cellulaires, l'ARNm β -actine est localisé en des régions subcellulaires délimitées. Ces types cellulaires incluent les fibroblastes embryonnaires de poulet (Lawrence et al., 1986), les fibroblastes 3T3 (Hill et al., 1994), les cellules endothéliales (Hooek et al., 1991), les neurones (Bassell et al., 1998) et les myoblastes C2 (Hill et al., 1993). Certains suggèrent que la ségrégation de l'ARNm β -actine induit une polarisation de la cellule via la distribution spatiale restreinte de β -actine synthétisée (Lawrence et Singer, 1986). Aussi, la délocalisation de cet ARNm par l'emploi d'oligonucléotides antisens dirigés contre sa séquence de localisation [voir plus bas], provoque une dépolarisation des cellules (Kislauskis et al., 1994) et perturbe la motilité cellulaire (Kislauskis et al., 1997).

La polarité cellulaire est essentielle au mouvement, dans ce sens où il y a une extrémité qui avance et une autre qui traîne. On retrouve ce type de mouvement lorsque les cellules migrent durant le développement embryonnaire ou en réponse à des agents chimotactiques (Ross et al., 1997). D'ailleurs la découverte que l'ARNm β -actine soit également transporté dans les neurites et les cônes de croissances de neurones en culture corrobore ce modèle (Bassell et al., 1998).

La localisation de l'ARNm β -actine, dépendante des filaments d'actine, est dirigée par une séquence de 52 nucléotides nommée *zipcode* [ce qui signifie « code postale » en anglais] et contenue dans le 3'UTR du transcrit (Kislauski et al., 1993 et 1994). Cette séquence a servi d'hameçon afin de repêcher des protéines capables de lier l'élément de localisation; une protéine de 68 kDa nommée zbp-1 [*zipcode binding protein* 1] (Ross et al., 1997). a systématiquement été retrouvée. L'introduction de mutations ponctuelles dans la séquence du zipcode qui désorganisent la localisation *in vivo* de

l'ARNm abolissent également l'interaction *in vitro* spécifique entre zbp-1 et le zipcode (Ross et al., 1997).

Le clonage à partir d'une génothèque d'ADNc de poulet a permis la caractérisation moléculaire de zbp-1. En accord avec l'hypothèse d'un rôle pour zbp-1 dans la localisation d'ARNm, la séquence primaire de son ADNc contient des domaines consensus de reconnaissance séquence-spécifique de l'ARN : un domaine RRM [*RNA recognition motif*] et quatre domaines KH (Nagai et al., 1995; Dejgaard et Leffers, 1996; Buckanovich et Darnell, 1997). Elle présente également des signaux de localisation nucléaire et un signal d'exportation semblable à ceux de REV du VIH-1, puis des séquences semblables à celles de protéines susceptibles de lier de l'ARN tel que hnRNP E1 et E2.

Le fait que Vg1RBP / Vera et zbp-1 soient impliqués dans la localisation de différents ARNm dans différents types de cellules suggère qu'il s'agit de facteurs généraux pour la localisation de l'ARNm. De plus, puisque l'ARNm β -actine est associé aux microtubules dans les neurones (Bassell et al., 1998) et aux filaments d'actine dans les fibroblastes (Sundell et Singer, 1991), cela suggère qu'à l'instar de l'ARNm *Vg1*, la localisation de l'ARNm β -actine puisse également être dépendante de ces deux types de composantes du cytosquelette (Havin et al., 1998; Deshler et al., 1997). Implicitement, cela suggère que ces protéines ne peuvent pas être tenue pour uniques responsable du transport de ces ARNm, mais plutôt que des interactions avec différents facteurs associés permet l'association au cytosquelette et / ou d'autre structures cellulaires, comme par exemple le réticulum endoplasmique.

3. Staufen

A. Rétrospective

Ce gène, identifié chez la drosophile, est historiquement le premier auquel fut attribué un rôle dans le transport et la localisation d'ARNm (St Johnston et al., 1989 et 1991). En accord avec un rôle direct dans le transport d'ARNm sous la forme de complexes RNP, la protéine Staufen présente **(1)** cinq copies de séquence consensus dsRBD (St Johnston et al., 1992) et **(2)** peut former des interactions protéine / protéine, comme dans le cas de la localisation de l'ARNm *prospero* (Matsuzaki et al., 1998; Schuldt et al., 1998; Shen et al., 1998).

Durant l'ovogenèse, cette protéine est impliquée dans la localisation des déterminants de l'axe antéro-postérieur *bcd* au pôle antérieur et *osk* au pôle postérieur (section II.2.A). Durant le développement embryonnaire du SNC, elle est également impliquée dans la division asymétrique des cellules précurseurs (section II.2.B.) ce qui suggère que c'est une protéine employée dans différents types cellulaires à une même fin : le transport et la localisation d'ARNm. Dans la prochaine section est offerte une description des domaines de liaison à l'ARNdb ainsi que de l'homologue mammifère Stau.

B. Le domaine de liaison à l'ARNdb

i. Un domaine conservé dans la phylogénie

Plusieurs protéines qui lient l'ARN présentent dans leur séquence primaire un domaine consensus d'environ 70 acides aminés capable de lier de l'ARN double brin (ARNdb) *in vitro*, d'où son appellation de dsRBD (*double stranded RNA binding domain*) (St Johnston et al., 1992; Bass et al., 1994; Green et Mathews, 1992). Ces dsRBD sont retrouvés parmi une panoplie de protéines à fonctions diverses, de la bactérie *E. coli* jusque chez l'homme (Bevilacqua et Cech, 1996; Kharrat et al., 1995; Krovat et Jantsch, 1996). Ils sont présents entre autre dans la RNase A de *E. coli* (Gibson et Thompson, 1994), dans la protéine Stau chez la drosophile (St Johnston et al., 1992) et dans TRBP et PKR chez l'humain (St Johnston et al., 1992; Gatignol et al., 1993).

ii. Un motif structural commun

Des études de RMN sur certains dsRBD en solution [Stau de drosophile, RNase III de *E. coli* et la PKR humaine] ainsi que la résolution du cristal d'un dsRBD en présence d'ARNdb [Xlrbpa chez *Xenopus*] ont permis d'en élucider la structure moléculaire. Ces études révèlent une structure secondaire α - β - β - β - α identique ce qui suggère un repliement structural conservé; un motif de liaison à l'ARNdb (dsRBM; *double strand RNA binding motif*). Le motif est représenté par une structure compacte dans laquelle les deux hélices α N- et C-terminales sont disposées du même côté d'un

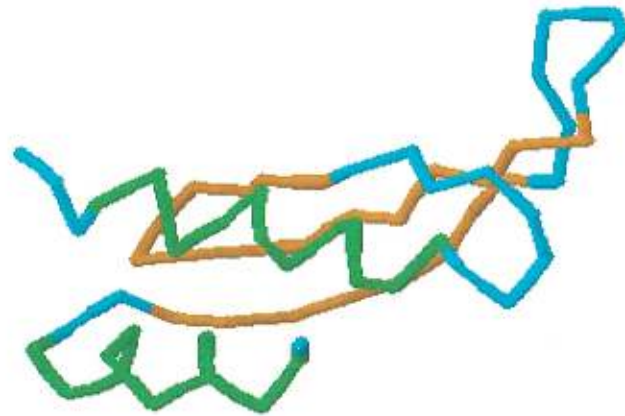


Schéma 4. Le motif de liaison à l'ARNdb

Représentation schématique du motif adopté par le domaine de liaison à l'ARNdb tel que déduit par les patrons de RMN ainsi que la résolution du cristal observé à 1,9 Å de domaines de liaison à l'ARNdb de différentes protéines chez différents organismes. Les hélices alpha sont en vert et les feuillets bêta sont en orange.

feuillet β à trois brins antiparallèles (Kharrat et al., 1995; Bycroft et al., 1995a et 1995b; Nanduri et al., 1998; Ryter et Schultz, 1998) {Schema 4}.

iii. Fonction du dsRBD

Un rôle attribué à ce domaine est sa capacité de lier *in vitro* de l'ARNdb, un hybride ARN/ADN ou de l'ARN simple brin hautement structuré (St.Jonhston et al., 1992; Bass et al., 1994; Bevilacqua et Cech, 1996; Bevilacqua et al., 1998; Wickham et al., 1999). Dernièrement, des résultats obtenus *in vitro* avec Xlrbpa chez *Xenopus* suggèrent qu'un de ses dsRBD soit suffisant pour faciliter l'hybridation entre deux brins complémentaires d'ARN (Hitti et al., 1998). Dans la cellule, cette protéine s'associe aux ribosomes ainsi qu'aux RNP hétérogènes nucléaires (Eckmann et Jantsch, 1997). Les auteurs de cette étude avancent l'hypothèse que cette propriété est exploitée par la cellule dans le contexte d'une chaperonne d'ARN qui aiderait au repliement structural correct des ARN.

iv. Affinité et spécificité de liaison à l'ARN double brin

La liaison *in vitro* d'un dsRBD à de l'ARNdb semble être indépendante de la séquence (Manche et al., 1992; St Johnston et al , 1992; Polson et Bass, 1994; Schweisguth et al., 1994; Krovat et Jantsch, 1996; Eckmann et Jantsch, 1997; Wickham et al., 1999) et sensible à des éléments présents dans le sillon mineur de l'hélice (Bevilacqua et Cech, 1996; Frugier et al., 1997). L'étude d'un cristal du deuxième dsRBD de Xlrbpa de *Xenopus* complexé avec de l'ARNdb observé à une résolution de 1.9 Å dévoile les interactions moléculaires sous-jacentes aux interactions ARNdb-protéine (Ryter et

Schultz, 1998). Cette étude démontre que le motif dsRBM s'étend sur 16 paires de nucléotides d'ARNdb d'une hélice de forme A, soit deux sillons mineurs adjacents et le sillon majeur entre ceux-ci. L'hélice α N-terminale interagit avec le premier sillon mineur, la boucle présente entre les brins β 1 et 2 interagit avec le deuxième sillon mineur et finalement l'hélice α C-terminale interagit avec le sillon majeur de l'ARN (Ryter et Schultz, 1998).

Certaines protéines présentent plusieurs copies de dsRBD. Lors d'études de liaison *in vitro* à partir des dsRBD isolés d'une même protéine, il apparaît que ceux-ci ne lient pas tous l'ARNdb avec la même affinité (Krovat et Jantsch, 1996; Wickham et al., 1999). Cette combinaison de domaines présentant des affinités variables pourrait être mise en jeu dans la spécificité *in vivo* puisqu'elle pourrait permettre une liaison coopérative entre les différents dsRBD sur une même hélice, modulant du coup l'affinité de la protéine pour un ARN donné (Nanduri et al., 1998; Shamo et al., 1995).

C. Homologue mammifère

Au sein de l'équipe du Dr. DesGroseillers, le clonage à partir d'une génothèque humaine de cDNA du système nerveux central de l'homologue mammifère de Stau a permis la caractérisation du premier candidat au transport de l'ARNm dans les cellules mammifères (DesGroseillers et Lemieux, 1996; Wickham et al., 1999; pour des revues : Kiebler et DesGroseillers, 2000; DesGroseillers et al., 1999).

La séquence primaire de l'ADNc révèle une protéine semblable à Stau chez la drosophile. La position relative ainsi que la séquence des dsRBD est relativement bien conservée {schéma 5}. L'épissage alternatif du gène génère plusieurs transcrits qui codent pour différentes isoformes de la protéine. D'ailleurs, une de ces isoformes

présente des affinités *in vitro* différentes pour l'ARNdb et module le contenu en ARN associé *in vivo* aux complexes RNP Stau lors d'études de co-immunoprécipitation (Duchaîne et al., soumis pour publication). Le rôle fonctionnel des différentes isoformes reste cependant en suspens et des études plus exhaustives sont requises pour approfondir les connaissances sur ce sujet.

Des études de liaison *in vitro* confirme l'affinité de Stau pour l'ARNdb de façon indépendante de la séquence primaire de l'ARN (Wickham et al., 1999; Marión et al., 1999). Les domaines susceptible de contribuer à cette liaison sont les dsRBD3 et dsRBD4, le domaine dsRBD3 étant le déterminant majeur (Wickham et al., 1999). Il est possible que *in vivo* d'autres protéines, d'autres isoformes de Stau ou des ARN associés aux complexes RNP et / ou des modifications post-traductionnelles sur Stau soient nécessaires pour moduler l'affinité de Stau pour un ARN spécifique. Comme chez la drosophile, les domaines dsRBD2 et dsRBD5 sont incapables de fixer *in vitro* de l'ARN, ce qui n'exclue pas un autre rôle possible pour ces domaines chez les mammifères. En effet, chez la drosophile ces domaines sont impliqués dans des interactions protéines / protéines essentielles à la localisation de certains ARNm (pour une revue : Jansen, 1999).

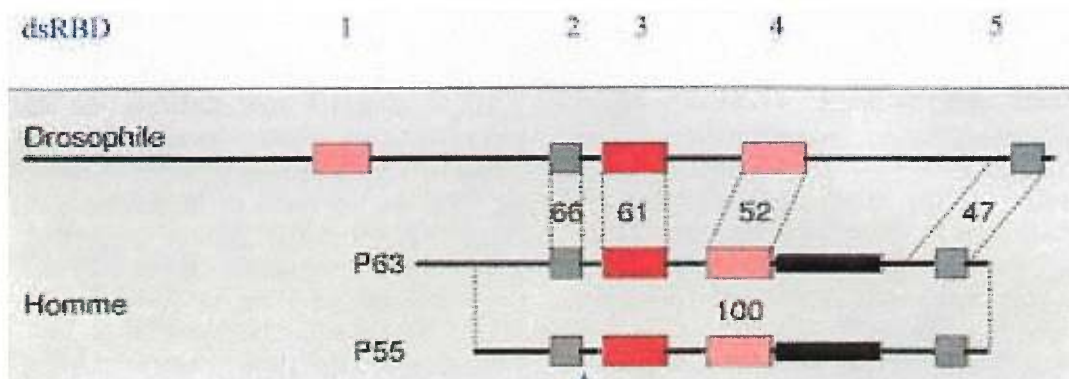


Schéma 5. Représentation schématique des ADNc codant pour les protéines Staufen humaines ainsi que celle de drosophile

Chez l'humain, un épissage alternatif permet de générer au moins deux isoformes de la protéine Staufen. La boîte rouge et les boîtes représentent respectivement le domaine majeur et les domaines mineurs de liaison à l'ARNdb. Les boîtes grises correspondent aux domaines qui possèdent une similitude de séquence avec les dsRBD, mais qui sont dépourvus d'une activité de liaison à l'ARNdb. La boîte noire représente le domaine de fixation à la tubuline. Les pourcentages d'identité entre les séquences des différents domaines sont indiqués.

Par buvardage de type Northern et de type Western on observe que cette protéine possède un don d'ubiquité. Par immunofluorescence Stau colocalise avec des marqueurs du réticulum endoplasmique rugueux [RER], mais puisqu'elle ne contient pas de peptide signal il est plus probable qu'elle soit cytosolique et associée à une structure du RER. Les polysomes que contient le RER sont une cible de choix puisque par centrifugation sur gradient de saccharose Stau cosédimente avec des polysomes et Stau est associée à des immunoprécipitats de protéines ribosomales (Luo M., communication personnelle). D'ailleurs, un lien entre le transport / localisation de l'ARNm et le RER est rapporté chez *Xenopus* ainsi que chez la drosophile (Wilsch-Bräuninger et al., 1997; Deshler et al., 1997). Par buvardage de type Far-Western, hStau peut interagir avec la tubuline ce qui pourrait en quelque sorte refléter le lien nécessaire entre les complexes RNP transportés et le cytosquelette.

Par microscopie électronique, on peut observer que dans les dendrites en culture de neurones de l'hippocampe de rat, Stau est colocalisée avec le réticulum endoplasmique, avec des microtubules et avec des complexes ribonucléoprotéiques qui contiennent des ARNm, des ribosomes et des facteurs de traduction (Kiebler et al., 1999; Knowles et al., 1996). L'emploi de la technique qui exploite la luminosité de la GFP (section II.1.D.) dans des neurones a permis d'observer le déplacement dans les dendrites, antérograde et rétrograde de complexes RNP qui contiennent la protéine Stau et de l'ARN (Köhrmann et al., 1999). Cette dernière étude représente le premier indice qui suggère que Staufen serait également impliqué dans le transport de l'ARN chez les mammifères.

IV. Un retour sur le modèle du transport et la localisation de l'ARN

Le transport et la localisation de l'ARN sont des moyens remarquables de distribuer l'information génétique et de permettre à des sous-domaines intracellulaires d'établir une identité biochimique propre. Cette ségrégation des messagers génétiques est observée dans plusieurs organismes ainsi que dans plusieurs types cellulaires différents (pour des revues : St Johnston, 1995; Arn et Macdonald, 1998; Oleynikov et Singer, 1998; Campos-Ortega, 1997; Bashirullah, 1998; DesGroseillers et al., 1999; Kiebler et DesGroseillers, 2000). Par exemple, la localisation d'ARNm maternels est essentielle à l'établissement de l'axe antéro-postérieur dans les ovocytes chez la drosophile et le xénope; chez la levure *S. cerevisiae*, elle est essentielle à la division asymétrique; dans les neurones, la localisation d'ARNm est essentielle à la mémoire et à l'apprentissage [section II].

Il semble maintenant évident que les principes de la localisation de l'ARN se sont conservés au travers de l'évolution. Généralement, des séquences contenues dans le 3'UTR des ARNm transportés sont nécessaires et suffisantes pour dicter leur transport (pour une revue : Oleynikov et Singer, 1998). Ces séquences permettent le recrutement de protéines qui forment alors des complexes RNP (Ainger et al., 1993; Knowles et al., 1996; Ferrandon et al., 1994). Ces complexes migrent le long du cytosquelette jusqu'à la destination spécifique au transcrit, puis y sont ancrés et traduits. Le transport se fait selon un mouvement actif, qui nécessite de l'énergie (Latham et al., 1994) et des moteurs moléculaires (Stephen et al., 1999; Bertrand et al., 1998; Erdelyi et al., 1995; Li et al., 1994; pour une revue : Arn et Macdonald, 1998).

La caractérisation des composantes des complexes RNP de transport permet d'en connaître plus sur le mécanisme de la localisation de l'ARN. Parmi les facteurs protéiques identifiés, notons des membres de la famille des hnRNP chez la drosophile et le

xénope, *zbp-1* (*actin zipcode-binding protein 1*) dans les fibroblastes et son homologue Vera / Vg1RBP chez le xénope, puis Staufén chez la drosophile et les mammifères [section III].

La traduction des ARNm transportés est modulée de façon spatio-temporelle (Sundell et Singer, 1990; Norvell et al., 1998; Li et Macdonald, 1999; pour une revue : Lasko, 1999) ce qui exige une répression de la traduction lors du transport de l'ARNm (Kim-Ha et al., 1991; Rongo et al., 1995; Gunkel et al., 1998). Ce contrôle peut, dans certains cas, être conféré par la présence parmi les composantes des complexes RNP de transport de certains facteurs qui moduleraient la traduction. En ce sens, des études génétiques chez la drosophile suggèrent un rôle pour Stau dans la dérégulation de la traduction ainsi que dans le transport des ARNm *osk* et *bcd* (Kim-Ha et al., 1991; Gunkel et al., 1998; Rongo et al., 1995; Markussen et al., 1995; St Johnston et al., 1989 et 1991).

V. La traduction chez les eucaryotes

Afin que le lecteur saisisse mieux les concepts auxquels il sera fait allusion dans les prochaines sections, la lecture de revues plus exhaustives sur le sujet de la traduction chez les eucaryotes est recommandée (Pain, 1996; Sonenberg et Gingras, 1998; Kimball, 1999; Curtis et al., 1995; Clemens et Bonner, 1999; Preiss et Hentze, 1999). Aux fins du présent mémoire, seront traités brièvement l'initiation de la traduction, le facteur eIF2, les structures en 5' de l'ARNm ainsi que la kinase PKR.

1. Survol du mécanisme d'initiation

L'initiation de la traduction protéique chez les eucaryotes peut se résumer en trois étapes {Schéma 6}:

- 1) L'association de l'ARNt d'initiation (ARNt_r-Met) ainsi que de plusieurs autres facteurs d'initiation avec la sous-unité ribosomique 40S pour former le complexe 43S de pré-initiation;
- 2) La liaison du complexe 43S sur l'ARNm suivie du balayage du 5'UTR (*untranslated terminal region*) jusqu'au codon d'initiation (habituellement le premier AUG);
- 3) L'association de la grosse sous-unité ribosomique de 60S au codon d'initiation afin de former un ribosome fonctionnel de 80S prêt pour la traduction avec hydrolyse du GTP (pour une revue voir : Pain, 1996).

La formation du complexe 43S de pré-initiation débute par la formation d'un complexe ternaire entre le facteur d'initiation eIF2, l'ARNt-méthionine (ARNt_r-Met) initiateur et une molécule de GTP. Par la suite, eIF2 transfère l'ARNt_r-Met à la petite sous-unité ribosomique formant alors le complexe 43S de pré-initiation. Ce complexe est également formé des facteurs eIF3 et eIF1A.

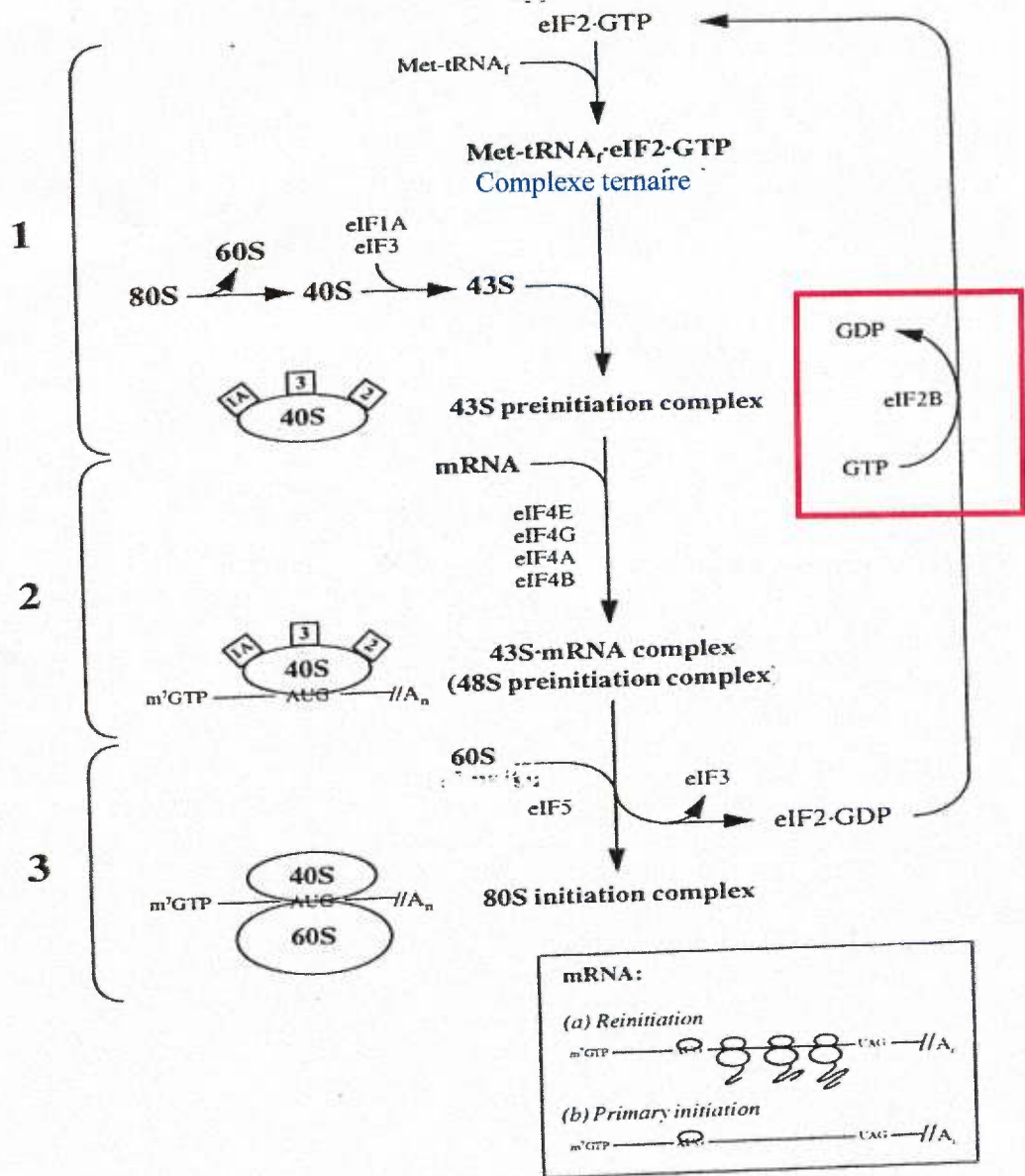


Schéma 6. Description simplifiée de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

L'encadré rouge indique l'étape de l'initiation de la traduction qui est sensible à l'état de phosphorylation du facteur d'initiation eIF2α.

La liaison du complexe 43S de pré-initiation sur l'ARNm débute par la liaison entre la coiffe 7-méthyl guanosine à l'extrémité 5' de l'ARNm et le complexe protéique eIF4F, qui est formé des protéines eIF4E, eIF4G, eIF4A et eIF3. Cette dernière interaction permet le recrutement de la petite sous-unité ribosomique sur l'ARNm formant alors le complexe 48S de pré-initiation. Afin que la traduction respecte le cadre ouvert, le complexe formé par la sous-unité ribosomique et l'ARNt_f-Met doit retrouver le codon d'initiation fonctionnel (habituellement le premier AUG). Pour y arriver, le complexe se livre à un balayage de la séquence de l'ARNm comprise entre la coiffe et le codon d'initiation adéquat.

2. Le facteur d'initiation eIF2

Le facteur d'initiation eucaryote eIF2 est un hétérotrimère composé des sous-unités α , β et γ (pour une revue : Kimball, 1999). Ce facteur forme un complexe ternaire avec une molécule de GTP et un ARNt_f-Mét. Le facteur eIF2 ainsi associé permet le transfert de l'ARNt_f-Mét à la sous-unité ribosomique 43S. Lorsque la sous-unité 60S se joint aux facteurs de traduction, le GTP est hydrolysé en GDP et eIF2-GDP est éjecté. Intervient alors le facteur eIF2B qui est nécessaire pour que le complexe eIF2-GDP puisse échanger le GDP pour une molécule de GTP; cet échange est essentiel pour qu'un autre cycle d'initiation puisse avoir lieu.

La phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF2 sur la sérine 51 hypothèque l'échange GDP/GTP en suscitant la formation d'un complexe indissociable entre eIF2B et eIF2-GDP. Puisqu'il y a 10 fois plus de eIF2 que de eIF2B dans une cellule, le moindre changement de l'état de phosphorylation de eIF2 α séquestre eIF2B et hypothèque l'initiation de l'élongation polypeptidique {Schéma 6}.

Il existe plusieurs kinases ayant eIF2 α comme substrat : la PKR, la HRI et la PERK (Harding et al., 1999) chez les mammifères et GCN2 chez la levure (pour une revue : Haro et al., 1996).

3. Influence des structures présentes en 5' de l'ARNm

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* démontrent clairement que les ARNm qui possèdent le potentiel de former des structures stables dans le 5' UTR sont difficilement traduits (pour une revue : McCarthy et Kollmus, 1995; Pain, 1996). Cet effet est modulé par la position de la structure dans le 5'UTR, ce qui suggère que la liaison de facteurs d'initiation ou de la sous-unité ribosomique 43S à l'ARNm est plus sensible aux structures secondaires que ne l'est le balayage. En effet, des études effectuées *in vitro* suggèrent que des structures présentes près de la coiffe empêchent des interactions cruciales avec les facteurs eIF4E et eIF4B, alors que le balayage du 5' UTR pourrait s'accommoder jusqu'à un certain point de structures complexes par le fait qu'il serait accompagné d'une activité hélicase qui détruirait ces structures secondaires.

4. PKR module la traduction

Le contrôle de l'expression génétique par la régulation de la traduction peut jouer un rôle important dans le métabolisme cellulaire et la différenciation (Sachs et al., 1997; Gray et Wickens, 1998). Plusieurs protéines agissent en *trans* et modulent les différentes étapes de la synthèse polypeptidique, cependant aux fins du présent mémoire il ne sera question que de la kinase PKR. Le lecteur avide d'information concernant ce sujet pourra consulter, avec profit, les excellentes revues déjà évoquées plus haut.

A. Rétrospective

La protéine kinase régulée par l'ARN ou PKR (aussi connue sous les termes de p68 kinase, DAI, dsI ou P1-eIF2) fut d'abord découverte dans les lysats de réticulocytes de lapin. En effet, ces lysats présentent une activité qui inhibe la synthèse protéique en réponse à la présence d'ARNdb (Clemens et al., 1975; Hunter et al., 1975). Par la suite, la même enzyme fut détectée dans des extraits de cellules en culture de mammifère et il fut remarqué qu'un traitement à l'interféron augmente l'expression (Hovanessian et al., 1980; West et al., 1979).

Le clonage, ainsi que la caractérisation moléculaire et physiologique de PKR ont démontré qu'il s'agit d'une protéine kinase de 68 kDa impliquée dans de multiples voies biochimiques qui comprennent :

- 1) La modulation de la prolifération cellulaire, de la traduction protéique, de l'apoptose et de la défense antivirale interféron-dépendante via la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 α (Samuel, 1993; Meurs et al., 1993; Lee et Esteban, 1993 et 1994; Lee et al., 1993; Zamanian-Daryoush et al., 1999; Der et Lau, 1995; Der et al., 1997) ;
- 2) La modulation de l'induction du signal des cytokines (pour une revue : Tan et al., 1999) et l'activation de la transcription par les facteurs NF- κ B et STAT1 (Gil et al., 1999; Garcia et al., 1998);
- 3) La modulation de la réplication du VIH-1 (Meurs et al., 1995; erratum dans Meurs et al., 1998);
- 4) La modulation de la prolifération cellulaire, entre autre via la phosphorylation du supresseur de tumeurs p53 (Cuddilhy et al., 1999a et b; pour une revue : Jagus et al., 1999).

Cependant, pour les fins du présent mémoire il ne sera question que de son rôle dans la modulation de la synthèse polypeptidique via la phosphorylation du facteur eIF2.

B. Structure

PKR présente en N-terminal deux copies consensus dsRBD séparées par un court segment mobile (Feng et al., 1992; Green et Mathews, 1992; McCormack et al., 1992; Patel et Sen, 1992; St Johnston et al., 1992). En C-terminal elle présente un domaine catalytique comportant au moins 11 motifs conservés sérine / thréonine kinase et la poche de liaison à l'ATP (Hanks et Quinn, 1991; Meurs et al., 1990). Dans le segment central, la PKR comporte une portion riche en sérines et thréonines qui sont autophosphorylées lors de l'activation (Taylor et al., 1996). Cette autophosphorylation est essentielle à l'activité catalytique de la kinase (Barber et al., 1994; Romano et al., 1995). {Schéma 7}.

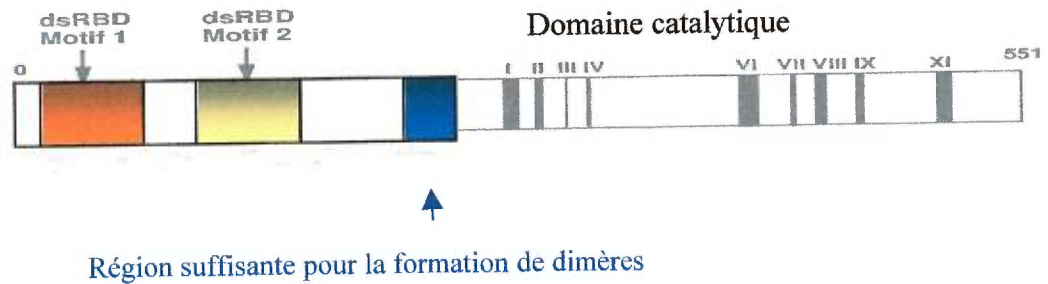


Schéma 7. Domaines fonctionnels de la kinase PKR

Représentation schématique de la séquence primaire de la kinase PKR. Les boîtes orange et jaune représentent respectivement le domaine de liaison à l'ARNdb majeur et le domaine mineur. La boîte bleue représente l'élément suffisant pour la formation de dimères PKR / PKR. Les boîtes noires représentent les séquences consensus sérines / thréonines kinase et sont identifiés par des chiffres romains.

Par immunofluorescence, il est observé que cette enzyme colocalise avec le réticulum endoplasmique ainsi que le nucléole (Jeffrey et al., 1995; Jimenez-Garcia *et al.*, 1993; Schwemmler et al., 1992). PKR co-sédimente avec les polysomes et cette association est dépendante d'éléments présents dans les deux dsRBD (Wu et Kaufman, 1996; Zu et al., 1997) ainsi que dans le domaine catalytique de la kinase (Wu et al., 1998). Cette association, croit-on, permet de cibler la kinase vers son site d'influence stratégique lui conférant alors un rôle prépondérant dans la modulation de la synthèse protéique.

C. Mécanisme d'activation

PKR est synthétisée sous une forme latente dont l'activation nécessite la présence d'ARNdb (Williams, 1995; Gunnery et Matthews, 1998). La courbe décrivant l'activation *in vitro* de PKR par l'ARNdb est bimodale dans ce sens où une faible concentration d'ARNdb s'avère activatrice alors qu'une haute concentration est inhibitrice (Ohtsuki et Baron, 1978; Williams et al., 1979). En présence d'ARNdb, PKR subit un changement de conformation, suit d'une autophosphorylation (Thomis et Samuel, 1993), puis elle s'active (Nanduri et al., 1998). L'activation de la kinase PKR entraîne *in vivo* la phosphorylation de eIF2 α (Chong et al., 1992) ainsi que celle d'autres protéines (Galabru et Hovanessian, 1985; Kumar et al., 1994; Brand et al., 1997).

D. Le modèle de la dimérisation

Une étude *in vitro* de filtration sur gel démontre qu'en absence d'ARNdb, PKR existe en équilibre sous deux formes, monomérique et dimérique, et que l'ajout d'ARNdb déplace l'équilibre vers les dimères (Carpick et al., 1997). Plusieurs études suggèrent que PKR se dimérise par l'entremise de ses dsRBD et que cette dimérisation est importante pour l'activité catalytique (Cosentino et al., 1995; Patel et al., 1995, 1996; Romano et al., 1995; Wu et Kaufman, 1996, 1997). Cependant, une autre étude démontre qu'un élément contenu dans le segment central, en C-terminal des dsRBD, est suffisant pour obtenir une interaction intermoléculaire *in vitro* ainsi que pour moduler l'activité kinase de PKR *in vivo* (Tan et al., 1998) {Schéma 7}.

Ce modèle de dimérisation est corroboré par une étude de filtration sur gel où les deux dsRBD recombinants de la PKR sont des monomères (Nanduri et al., 1998) et des études de RMN et de cristallisation qui n'ont permis d'observer que des structures monomères des dsRBD de Stau [drosophile], de RNase III [*E. coli*], de PKR [humain] et de Xlrpba [*Xenopus*] (Kharrat et al., 1995; Bycroft et al., 1995a et 1995b; Nanduri et al., 1998).

Ce modèle de dimérisation implique que PKR présente des motifs d'interactions protéine / protéine et suggère la possibilité d'interactions par des facteurs cellulaires susceptibles de réguler son activité kinase.

E. TRBP est un modulateur cellulaire de PKR

Les protéines kinases cellulaires occupent une position cruciale dans la propagation, la régulation et la coordination de signaux nécessaires à de nombreux processus biologiques qui incluent le métabolisme, l'expression de gènes, la croissance

cellulaire, la différenciation ainsi que le développement. Une telle importance physiologique pour ces protéines kinases entraîne subséquemment l'élaboration par la cellule de nombreux mécanismes de contrôle de l'activité kinase de ces protéines. Parmi ceux-ci, notons des mécanismes qui exploitent l'association entre des domaines ou des sous-unités qui inhibent l'activité catalytique par un processus d'auto-régulation (Johnson et al., 1996; Kemp et al., 1991) ou des domaines qui ciblent les kinases en des localisations intracellulaires et / ou des substrats différents (Faux et Scott, 1996; Hubbard et Cohen, 1993). De plus, d'autres mécanismes exploitent plutôt des associations avec des protéines activatrices ou inhibitrices (Elledge et Harper, 1994; Zhang et al., 1993), suscitant des phosphorylations réversibles (Denu et al., 1996; Hofer, 1996) ou la formation de multimères (Heldin, 1995; Stock, 1996).

Plusieurs études suggèrent que l'activité kinase de PKR est modulée par des facteurs cellulaires. Notons les facteurs cellulaires inhibiteurs p58^{IPK} (Tan et al., 1998), la protéine L18 de la grosse sous-unité ribosomale 60S (Kumar et al., 1999; Raine et al., 1998) et TRBP (Park et al., 1994; Benkirane et al., 1997), les activateurs RAX (Ito et al., 1999) et PACT (Patel et Sen, 1998) ainsi que les inhibiteurs viraux Tat (Brand et al., 1997) et NS1 (Hatada et al., 1999; Lu et al., 1995) qui modulent l'activité catalytique de la kinase PKR *in vitro* et *in vivo* via des interactions protéine / protéine (Tan et Katze, 1998). Pour une question pragmatique et évidente d'espace, il ne sera traité ici, parmi la multitude de facteurs protéiques qui régulent l'activité de PKR, que de TRBP.

i. Rétrospective

La protéine humaine TRBP (*TAR RNA Binding Protein*) fut identifiée par deux criblages indépendants de librairie d'expression de cDNA de cellules HeLa à la recherche de protéines ayant la capacité de lier *in vitro* une sonde d'ARN TAR du VIH-1 (Gatignol

et al., 1991 et section V.5) ou une sonde d'ARN de l'élément de réponse à la protéine Rev (RRE) du VIH-1 (Park et al., 1994).

L'étude de la séquence primaire de l'ADNc partiel de TRBP (TRBP cellulaire fait 55 kDa alors que l'ADNc code pour une protéine de 37 kDa : Blair et al., 1995) dévoile qu'elle contient deux dsRBD; le deuxième de ces domaines lie *in vitro* de l'ARNdb et la structure TAR avec la même affinité que la protéine entière (St Johnston et al., 1992; Gagnol et al., 1993; Erard et al., 1998). L'homologue chez la souris a également été cloné (Kozak et al., 1995).

ii. L'association avec la TRBP module l'activité kinase de la PKR

Certaines études suggèrent que TRBP possède une activité susceptible de moduler l'activité de la kinase PKR. Une étude de cotransfection dans des cellules COS-1 démontre que la surexpression de TRBP inhibe l'activation de PKR et diminue dramatiquement la phosphorylation de eIF2 α *in vivo* (Park et al., 1994). TRBP possède également un potentiel oncogénique puisque sa surexpression provoque un phénotype de transformation et induit la formation de tumeurs chez la souris (Benkirane et al., 1997).

Des études d'interactions *in vitro* de type Far-Western et *in vivo* de type double-hybride chez la levure suggèrent que TRBP peut former des homodimères et qu'elle peut également former des hétérodimères avec PKR (Cosentino et al., 1995). De plus, TRBP co-immunoprécipite avec PKR à partir d'extraits cellulaires HeLa ou de cellules d'insectes (Benkirane et al., 1997; Blair et al., 1995). À partir d'extrait de cellules HeLa la protéine TRBP endogène est également retenue par une chromatographie d'affinité sur laquelle est immobilisée PKR recombinante (*Pool down*) de façon ARN-indépendante (Benkirane et al., 1997).

En conclusion, TRBP, qui est un membre de la famille des protéines possédant des dsRBD, est susceptible de moduler l'activité kinase de PKR *in vitro* et *in vivo* via la formation d'hétérodimères catalytiquement inactifs.

5. La structure TAR et la traduction

A. Une rétrospective sur le VIH-1 et le SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Gallo, et al., 1983; Gelmann et al., 1983). Le cycle infectieux du rétrovirus VIH-1 est un processus hautement régulé dans lequel sont impliqués de nombreux gènes agissant en *trans* ainsi que des séquences régulatrices agissant en *cis* situées sur la longue séquence terminale (LTR : *long terminal repeat*) ou ailleurs dans le génome viral (pour une revue voir : Jones et Peterlin, 1994). Dans ce contexte, il apparaît que le système ayant été le plus étudié est sans nul doute le système TAR/Tat du VIH-1.

B. L'ARN TAR adopte un repliement hautement structuré

La séquence d'ADN TAR (*trans-acting responsive*) sert de point d'ancrage à de nombreuses protéines cellulaires, par exemple UBP-1 / LBP, dont le rôle est probablement de moduler le taux d'expression basal du LTR (Garcia, et al., 1987a, 1987b; Jones, et al., 1988; Wu, et al., 1988). L'attrait de cette séquence réside principalement dans la capacité que possède son ARN d'adopter une structure secondaire stable tige-boucle avec

protubérance (Muesing et al., 1987; Colvin et Garcia-Blancos, 1992; Puglisi et al., 1992; Hauber et Cullen, 1988; Chang et al., 1997) {figure 2B}.

Cette séquence adjacente au promoteur est présente en 5' de tous les ARNm viraux produits par le VIH-1 (Muesing et al., 1985 et 1987). La structure qu'adopte l'ARN possède la capacité de lier *in vitro* et *in vivo* de nombreuses protéines cellulaires et virales (Gatignol et al., 1989; Park, et al., 1994; Rounseville et al., 1992; Chang et al., 1994). Manifestement ceci reflète son importance physiologique puisque la viabilité du virus dépend de sa séquence primaire ainsi que de l'intégrité de sa structure secondaire (Rounseville et al., 1996; Verhoef et al., 1997). La séquence TAR est également impliquée dans plusieurs étapes du cycle infectieux du VIH-1 : la *trans*-activation et la régulation de la traduction (pour une revue : Jones et Peterlin, 1994). Cependant, pour les fins du présent mémoire il ne sera discuté que de son rôle dans la traduction.

C. TAR inhibe la traduction *in vitro*

La structure TAR, tout comme n'importe quelle autre structure complexe dans le 5' UTR (section V.3), rend la traduction d'ARNm difficile dans des extraits de cellules Hela, des lysats de réticulocytes de lapins (RRL) ainsi que lorsque cet ARNm est microinjecté dans des ovocytes de *Xenopus* (Parkin et al., 1988). Le mécanisme par lequel la séquence TAR inhibe la traduction a suscité bien des controverses. Alors qu'il semble clair que cette structure rend difficilement accessible la coiffe (Parkin et al., 1988), sa capacité d'activer les voies d'inhibition de la traduction ARNdb-dépendante, soit celle dont font partie PKR et la (2'-5') oligoadénylate synthase, a initialement suscité de multiples débats. Alors qu'il semble clair que PKR peut lier l'ARN TAR, pour certains la fonction de cette association est d'activer PKR, ce qui inhibe alors la traduction (Nekhai et

al., 1996; Edery et al., 1989; SenGupta et al., 1990; Geballe et Gray, 1992; Maitra et al., 1994; Svitkin et al., 1994, Carpick et al., 1997; Choudhury et al., 1999), alors que pour d'autres elle empêche l'activation de PKR, ce qui stimule alors la traduction (Gunnery et al., 1990 et 1992).

Aujourd'hui, le modèle accepté est celui selon lequel la structure de l'ARN TAR inhibe la traduction en rendant la coiffe peu accessible et en activant PKR. Dans la prochaine section, le lecteur retrouvera l'exemple de deux protéines qui influencent la traduction d'ARNm contenant la structure TAR en 5' soit les protéines Tat et La.

D. Exemples de protéines qui lèvent l'inhibition de TAR

i. **La protéine Tat du lentivirus VIH-1**

1. Rétrospective

Le *trans*-activateur de la *transcription* (Tat) est une protéine virale du VIH-1 principalement localisée dans le noyau de l'hôte (Stauker et Pavlakis, 1998). Cette protéine, constituée de 101 acides aminés, est conservée chez tous les lentivirus de primates (pour une revue voir : Rana et Jeang, 1999). Tat active la transcription d'une façon atypique en ce sens où elle ne reconnaît pas une séquence spécifique sur l'ADN, mais plutôt sur l'ARN TAR naissant (Rosen et al., 1985). Cette interaction protéine-ARN (Hamy et al., 1993) permet le recrutement de Tat et crée un enrichissement local en Tat près du complexe d'initiation de la transcription (Southgate et Green, 1991). Tat fonctionne probablement de façon à stimuler l'élongation de transcrits de l'ARN polymérase II, cette dernière étant normalement arrêtée près du site d'initiation de la

transcription en absence de Tat (Keen et al., 1996). Plusieurs études suggèrent que des interactions entre des protéines cellulaires et Tat / TAR soient essentielles pour cette fonction (Jones, 1997; Mavankal et al., 1996; Parada et Roeder, 1996; Southgate et al., 1990; Wu-Baer et al., 1995; Zhou et Sharp, 1995).

En plus de cette action au niveau de la transcription, certaines études suggèrent que Tat posséderait également une influence sur la traduction (Braddock et al., 1989; Cullen, 1986; Huang et al., 1994; Rosen et al., 1986; Choudhury et al., 1999).

2. Tat et la traduction

Une étude récente effectuée *in vivo* dans des cellules en culture démontre un rôle de Tat au niveau post-transcriptionnel (Choudhury et al., 1999). Lors de cette étude les auteurs utilisent une lignée cellulaire stable exprimant le gène rapporteur CAT sous le contrôle du LTR du VIH-1 à laquelle ils transfectent un plasmide encodant Tat, puis traitent les cellules en culture avec un antagoniste de Tat (Tat9-K-biotine : Wang et al., 1995). Ce peptide antagoniste fait compétition avec Tat pour la liaison sur TAR (Wang et al., 1995). Dans des cellules en culture, Tat9-K-biotine inhibe l'augmentation Tat-dépendante de l'expression d'un gène rapporteur (CAT) sous le contrôle du promoteur du HIV-1 (Choudhury et al., 1998). Les auteurs observent que l'action antagoniste du peptide ne se situe pas au niveau de la quantité d'ARN TARCAT LTR (i.e. ARN CAT avec la séquence TAR en 5' dérivée du LTR), mais plutôt en l'inhibition de l'association de l'ARN TARCAT avec les polysomes normalement observée lors de la transfection avec Tat.

Une autre étude effectuée *in vitro* dans des RRL (SenGupta et al., 1990) démontre également que la protéine Tat peut stimuler la traduction d'un ARNm portant la séquence TAR à son extrémité 5'. Cette stimulation est également présente lorsque l'activité

ARNdb-dépendante de deux inhibiteurs, soit la kinase PKR et la (2'-5') oligoadenylate synthase, sont réprimées par l'emploi de 2 aminopurine (2 AP) et de ppp(5')I(2')p(5')A(2')p(5')A (p₃IAA) respectivement (Williams et al., 1979; Imai et al., 1985).

Ces deux études *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'activateur de la transcription Tat favorise l'association autrement déficiente entre les polysomes et l'ARN TARCAT et stimule la traduction selon un mécanisme PKR indépendant.

ii. L'autoantigène La

1. Rétrospective

À l'origine cette protéine fut identifiée comme étant la composante protéique de complexes RNP immunogéniques pour des anticorps contenus dans le sérum de patients souffrant de la maladie auto-immune du Lupus systémique érythémateux ou du syndrome de Sjögren (pour une revue : Tan, 1989). La caractérisation de ces complexes RNP dévoile un contenu en ARN transcrits par la polymérase III, soit l'ARNr précurseur 5S et des ARNt, associés à la protéine La, (Rinke et Steitz, 1982; Steitz et al., 1983). De multiples études démontrent que La (*Lupus autoantigen*) est une protéine principalement nucléaire qui peut cependant faire la navette vers le cytoplasme, qu'elle est conservée dans la phylogénie et essentielle pour certaines fonctions cellulaires, mais que selon l'espèce cette dernière exigence varie (Chan et al., 1986; Francoeur et al., 1985; Meerovitch et al., 1993; Bai et al., 1994; Yoo et al., 1994; Lin-Marq et al., 1995; Pardigion et al., 1996; Pellizzoni et al., 1996; van Horn et al., 1997).

2. Structure et fonction

La est modulaire : elle présente en N-terminal un domaine consensus RRM qui permet la liaison à de l'ARN simple brin et potentiellement un dsRBD (Chan et al., 1989; Clemens 1993, James et al., 1995) et en C-terminal un domaine basique essentiel pour de multiples fonctions (Goodier et al., 1997; Bachmann et al., 1997; Craig et al., 1997; Svitkin et al., 1994a) qui contient des phosphosérines et comporte un élément essentiel à la formation d'homodimères *in vitro* (Craig et al., 1997).

La recherche du rôle physiologique de La a fourni de multiples fonctions possibles (pour une revue : Lodomery 1997). Par exemple, des études *in vitro* suggèrent que dans des extraits de cellules mammifères en culture La soit essentielle à la transcription, la terminaison et le recyclage de l'ARN polymérase III (Maraia, 1996), probablement via un mécanisme qui exploite son affinité, démontrée *in vitro*, pour l'extrémité 3' caractéristique des ARN transcrits par cette polymérase (Stephano, 1984). Des études génétiques suggèrent que l'homologue chez la levure soit essentiel à la maturation des ARNt (Yoo et Wolin, 1997); d'autres études suggèrent que l'homologue du *Xenopus* soit essentiel, via une liaison sur le 5' UTR, à la coordination de la traduction des ARNm des protéines ribosomales (Pellizzoni et al., 1996). D'autres études démontrent également l'implication de La dans la traduction coiffe-indépendante via l'IRES des ARNm des picornavirus (Meerovitch et al., 1993; Svitkin et al., 1994a; Craig et al., 1997).

Aux fins du présent mémoire, une seule des multiples fonctions de La est retenue : sa capacité d'influencer la traduction coiffe-dépendante de transcrits contenant des séquences virales.

3. La et la traduction

Une étude effectuée au sein de l'équipe de Sonenberg (McGill, Montréal, Qc.) a démontré que l'inhibition de la traduction *in vitro* d'un ARN possédant la structure TAR du HIV-1 à son extrémité 5' est levée en présence de quantités croissantes de protéine La recombinante purifiée (Svitkin et al., 1994b). Une étude concomitante démontre également que La recombinante est capable d'interagir directement avec TAR *in vitro* et que la protéine endogène La et des ARN contenant la séquence TAR co-immunoprécipitent dans des lymphocytes infectés au VIH-1 (Chang et al., 1994). De plus, des études précédentes avaient démontré que La :

1. Possède une activité hélicase *in vitro* ATP-dépendante susceptible de séparer deux brins d'ARN (Bachmann et al., 1990; Xiao et al., 1994; Huhn et al., 1997)
2. Possède la capacité d'inhiber *in vitro* l'activation de la PKR par l'ARNdb (Xiao et al., 1994)
3. Co-immunoprécipite avec l'ARNr 18S et co-sédimente avec la petite sous-unité ribosomale à partir de fractions cytoplasmiques (Peek et al., 1996)

Le modèle proposé pour l'effet de La sur la traduction d'un ARN portant la structure TAR à son extrémité 5' est que La est recrutée au site de traduction via une association avec la structure TAR, l'ARN 18S ou la petite sous-unité ribosomique, puis qu'elle y empêche l'action de la PKR par la destruction via son activité hélicase ATP-dépendante d'éléments d'ARNdb contenus dans TAR qui sont essentiels à l'activation de la kinase. Cette activité enzymatique de La faciliterait aussi l'étape d'initiation de la traduction en permettant un accès plus facile à la coiffe et / ou un balayage plus efficace du 5'UTR.

VI. Problématique du projet

Notre équipe de recherche étudie le rôle fonctionnel de l'homologue humain de Stau [hStau]. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à ce jour suggère que hStau puisse jouer un rôle important dans le transport et la localisation de transcrits tout comme chez la drosophile.

Chez les mammifères, la protéine hStau colocalise avec des marqueurs du réticulum endoplasmique [ER] qui est une structure où l'on retrouve une forte activité de synthèse polypeptidique (Wickham et al., 1999; Marión et al., 1999). On croit que la protéine est cytosolique et ne fait pas partie de la lumière ou de la membrane du ER puisqu'il manque à la séquence primaire de son ADNc les séquences consensus de la translocation dans la membrane ou du peptide signal. De plus, hStau cosédimente sur un gradient de saccharose avec les polysomes et est associée à un immunoprécipitat de protéines ribosomales (Marión et al., 1999; Luo et DesGroseillers, communication personnelle).

Chez la drosophile, des études génétiques ont démontré que *Stau* est un gène important pour la localisation asymétrique d'ARNm durant l'ovogenèse et l'embryogenèse : des ovocytes issues de femelles homozygotes pour des mutations dans ce gène ont des défauts de développement imputables à l'expression aberrante d'ARN spécifiques. La caractérisation au niveau moléculaire a démontré que la protéine Staufen colocalise avec les ARNm transportés, qu'elle peut former des complexes RNP avec certains ARN transportés, plus spécifiquement en se fixant à des éléments présents dans leur 3'UTR, et que la localisation intracellulaire de ces deux entités est sensible aux mêmes drogues qui perturbent le réseau de microtubules. Ces observations suggèrent que Stau soit importante dans le processus de la localisation de l'ARN.

De plus, il semble que *Stau* ait également un rôle dans la dérépression des ARNm transportés. Comme mentionné auparavant, la traduction des ARNm est réprimée lors du transport et déréprimée lorsque les transcrits sont correctement localisés, il s'en suit une régulation spatio-temporelle. Les mécanismes par lesquels survient cette répression / dérépression ne sont pas bien connus. Dans le cas de l'ARNm *osk*, des éléments BRE dans le 3'UTR sont essentiels pour la répression et la séquence en 5'UTR est essentielle pour la dérépression. Dans un ovocyte issue d'une femelle de type sauvage, l'ARNm d'un transgène *osk* sans ces séquences BRE est traduit tout le long de son transport (Gunkel et al., 1998; Kim-Ha et al., 1995). Cependant, dans un ovocyte issue d'une femelle homozygote *Stau*^{D3}, sans protéine Staufén détectable, cet ARNm *osk* sans séquences BRE n'est pas traduit (Gunkel et al., 1998; Kim-Ha et al., 1995). Ce qui suggère que *Stau* puisse jouer un rôle dans la traduction de l'ARNm *osk*.

La possibilité d'un rôle direct dans la traduction est également observée avec l'ARNm *bcd*. En effet, les défauts de l'axe antéro-postérieur observés dans les embryons issus de femelles mutantes pour *Stau* suggèrent une activité de la protéine bicoïd réduite plutôt que dispersée, comme cela serait le cas dans une localisation antérieure déficiente (Driever et Nüsslein-Volhard, 1988). De plus, l'importance de la délocalisation des ARNm *bcd* dans des mutants *Stau* (Ferrandon et al., 1994) peut être imitée par des mutations dans le 3'UTR de *bcd* qui n'affectent pas l'établissement de l'axe antéro-postérieur (Macdonald et al., 1993). Ainsi, les défauts au niveau de la localisation de l'ARNm *bcd* observés dans les mutants *Stau* ne peuvent être uniquement responsables des défauts du développement des structures antérieures (Kim-Ha et al., 1995). D'ailleurs, chez la drosophile, les études génétiques qui étudient le rôle de *Stau* dans le transport des ARNm *osk* et *bcd* suggèrent un rôle au niveau de la dérépression de la traduction de ces ARNm transportés (Kim-Ha et al., 1995; Gunkel et al., 1998).

VII. Objectifs du projet de recherche de maîtrise

Afin de caractériser un éventuel rôle de hStau dans la traduction, nous avons conçu une étude *in vitro* qui évalue l'influence de hStau sur la traduction d'ARN synthétiques. Le système utilisé exploite les réticulocytes de lapins [RRL], la protéine recombinante hStau purifiée et soluble, ainsi que deux types d'ARN : un normalement traduit et un autre dont la traduction est réprimée par l'ajout de la séquence TAR du HIV-1 à son extrémité 5'. Pour une discussion sur les rendements et le succès des différentes techniques utilisées, le lecteur est renvoyé au chapitre Discussion. Les buts établis sont les suivants :

[1] Optimiser un protocole afin d'obtenir de la protéine hStau purifiée et soluble. Les techniques employées seront l'introduction de 6 histidines en N-terminal qui permettent la purification de protéines recombinantes sur colonne d'affinité Ni-NTA [Qiagen] ainsi que diverses méthodes de changement de tampon telles que la dialyse ou l'ultracentrifugation.

[2] Employer un essai de liaison en solution à de l'ARN. En effet, puisqu'aucun rôle biologique n'est connu pour hStau il s'en suit qu'aucun test n'est disponible pour quantifier le repliement natif d'une préparation de protéine donnée. Une liaison à de l'ARN est indicatif d'un repliement natif du dsRBD3, domaine responsable de la liaison de l'ARNdb *in vitro* (Wickham et al., 1999), ce qui suggère qu'il existe une probabilité que le reste de la protéine soit également repliée selon la conformation native.

[3] Déterminer les conditions utilisés dans l'essai de traduction *in vitro*. Dans des RRL, chaque ARN est traduit selon un patron spécifique qui peut être affecté par plusieurs facteurs différents : les structures secondaires adoptées par l'ARN à son extrémité 5', la présence d'une coiffe ⁷mGpppG en 5', la présence d'une queue de polyadénine, la concentration en sels et en ARN, etc. Puisqu'une étude avec les mêmes ARN a déjà été

rapportée dans la littérature nous utiliserons pour toutes ces variables, excepté la concentration en ARN, le protocole établie par Svitkin et al. (1994). Une haute concentration en ARN est susceptible de saturer le système des RRL et ainsi empêcher d'apprécier une éventuelle stimulation de la traduction. Afin d'éviter ce genre d'artéfact, nous devons déterminer à qu'elle concentration en ARN nous allons étudier l'effet de hStau. La traduction des deux ARN sera faite dans des RRL selon des quantités d'ARN croissantes, puis une seule concentration sera choisie pour les essais avec hStau.

Les taux de traduction seront estimés par la quantité de protéine CAT traduite. Deux essais sont envisagés : le premier consiste à observer l'incorporation de Mét[S³⁵] dans la protéine traduite par l'autoradiographie d'un gel de polyacrylamide sur lequel aura migré un échantillon de la réaction de traduction; le deuxième consiste à évaluer la concentration de CAT traduite par essai immunologique ELISA anti-CAT.

[4] Un effet de hStau sur la traduction peut être dû aux mécanismes suivants : (a) compétition avec la sérine / thréonine kinase PKR pour les substrats d'ARNdb ou le site d'association sur les polysomes; (b) activité hélicase associée à hStau qui permettrait la destruction de structures d'ARNdb présentes sur les ARN synthétiques utilisés dans l'expérience; (c) formation de complexes RNP qui sont plus actif dans la traduction.

Afin d'étudier le mécanisme d'action de hStau, l'effet de hStau sur la traduction sera étudié dans des RRL sans activité endogène de la kinase PKR générés par l'emploi concomitant de 2-aminopurine, une drogue qui inhibe l'activité sérine / thréonine kinase. Un essai d'activité hélicase *in vitro* avec la protéine recombinante et purifiée est également envisagé afin d'évaluer la capacité de hStau de désenrouler une hélice d'ARNdb.

[5] Enfin, en se basant sur les mécanismes connus par lesquels la structure TAR inhibe la traduction, sur les résultats de biologie cellulaire et d'études génétiques obtenus avec Staufen chez les mammifères et chez la drosophile respectivement, nous proposerons

un mécanisme d'action de hStau sur la traduction dans des RRL ainsi qu'un modèle cellulaire qui tient compte de cette activité dans le contexte du transport et de la localisation de l'ARN.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériels et méthodes

I. Expression et purification des protéines recombinantes

L'ADNc de HFBDQ correspond à la séquence de Staufén d'humain comprise entre le site *Bam*HI et l'extrémité 3' endogènes et code donc pour une protéine Staufén tronquée à laquelle il manque, en N-terminal, la séquence du dsRBD2 [M_r de HFBDQ est d'environ 45 kDa] . Le plasmide La-pQE code pour l'autoantigène La [45 kDa] et le plasmide NEP-pQE pour un fragment protéique de l'endopeptidase neutre NEP [25 kDa]. Toutes ces fusions sont exprimées dans *E.coli* BL21 / pREP4 par induction à l'IPTG [3 h] et contiennent en N-terminal 6 histidines [6xHis] qui permettent une purification sur colonne d'affinité Ni-NTA (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant, avec toutefois les modifications qui suivent :

Tableau 2

**Conditions modifiées de purification sur colonne d'affinité Ni-NTA
en conditions dénaturantes**

Tous les tampons sont enrichis de 500 mM NaCl, et 20 % glycérol
et sont ajustés à pH 7,9.

Tampon de lyse et de liaison : 10 mM imidazole, 6M Gu-HCl, 10 mm β-ME

Tampon de lavage : 30 mM imidazole, 8 M urée

Tampon d'élution : 300 mM imidazole, 6 M urée

Huit fractions d'éluats de 0,5 ml sont recueillies et un échantillon est prélevé afin d'évaluer le degré de pureté de hStau, de NEP et de La par coloration au bleu de Coomassie d'un gel de polyacrylamide 10%. Afin d'éliminer l'urée, le NaCl, l'imidazole et ainsi permettre le repliement natif de la protéine, deux fractions d'éluat sont diluées 1 : 10, goutte-à-goutte, dans un tube contenant du tampon de renaturation maintenu à 4°C (2 M urée, 0,1 M NaH₂PO₄, 25 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 25% glycérol, pH 7,5), avec léger vortex puis incubées à 4°C pendant 1h. La protéine est concentrée 10 : 1 par ultracentrifugation (25 °C, pendant 15 min, 2500 g) sur membrane poreuse Centriprep [Amicon 30kDa] par deux centrifugations successives. Par la suite, la protéine est diluée 1 : 10 dans du tampon d'entreposage maintenu à 4°C et recentrifugée de la même manière [25 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM β-ME et 25% (v/v) glycérol]. Une dernière concentration est faite sur Centricon 10kDa [25 °C, pendant 1h, 2500 g] jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,5 mg / ml. Des fractions de la protéine purifiée sont entreposées à -80 °C et ne sont dégelées qu'une seule fois pour fin d'utilisation.

II. Construction de plasmides

Les plasmides p48, p49, p50, p52 et La-pBS [SK] sont une gracieuseté de KT Jeang (NIH/NIAID Bethesda, MD) et les plasmides SpIII-10 CAT et pSP64TARCAT sont de E. Cohen (Université de Montréal, Montréal). Tous les plasmides sont purifiés sur colonne Midiprep selon le protocole de Qiagen.

Les plasmides encodant les TAR mutants pCD, pEF, pGH, pIJ et pAB sont construits à partir de p48 et p49 {figure 4} par clonage d'oligonucléotides synthétiques {tableau 3} en exploitant les sites de restriction endogènes à la séquence TAR. En

rouge on observe les séquences avec des mutations ponctuelles et les tirets bleus indiquent une délétion.

Tableau 3
Oligonucléotides utilisés pour la construction
de séquences TAR mutantes

Identification	Séquences
A	5' CTCTGGCTAACTAACTAGGGAACCCG 3'
B	3' TCGAGAGACCGATTGATTGATCCCTTGGGCCTAG 5'
C	5' GATCTGAGCCC AAA AGCT 3'
D	3' ACTCGGG TTT 5'
E	5' AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG TCG CTGGGAGCT 3'
F	3' ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCTAGAC AGC GACCC 5'
G	5' AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGA___GAGCCTGGGAGCT 3'
H	3' ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCT___CTCGGACCC 5'
I	5' AGCTTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGAA AAG GAGCCTGGGAGCT
J	3' ACCCAGAGAGACCAATCTGGTCT TTCT CGGACCC 5'

Une modification dans le MCS de tous les plasmides, avant le clonage des oligonucléotides, est obligatoire à cause de la présence d'un site de restriction *SacI* dans la séquence codant pour TAR, dans les oligonucléotides et dans le MCS. La construction p48sec est obtenue par la ligation des bouts francs de p48 générés suite à une digestion par *SmaI* et *EcoRI* suivie du traitement par le fragment Klenow/4dNTPs. De même, les mutants p49ae et p50ae dérivent de la ligation des bouts francs issus de la digestion par *AvaI* et *EcoRI* suivie du traitement par le fragment Klenow/4dNTPs.

Le plasmide pSP64CAT dérive de la ligation du digestat par *Hind*III de SpIII-10 CAT où la séquence TAR est éliminée.

Le plasmide codant pour une fusion La-6xHis est obtenu par ligation des digestats *Bam*HI et *Hind*III du vecteur pQE31 [Qiagen] et du plasmide La-pBS [SK] et transformé directement par électroporation dans une souche BL21 de *E. coli* portant le plasmide pREP4. Un clone exprimant la protéine est identifié par immunobuvardage [anti-6xHis] d'une membrane sur laquelle sont transférées les colonies résultantes de la transformation. Les colonies positives sont observées par détection aux réactifs ECL et autoradiographie [Amersham Corp.].

Toutes les constructions sont confirmées par séquençage aux didésoxynucléotides selon les indications du fabricant [Amersham Pharmacia Biotech].

III. Synthèse d'ARNm

Tous les plasmides codant les différentes séquences virales TAR, pour CAT et TARCAT sont linéarisés en aval des portions codantes par *Bam*HI [ou par *Xba*I dans le cas de TARp52]. Une fois la digestion complète [observée sur gel d'agarose 1%] le produit de digestion est extrait deux fois au phénol/chloroforme puis précipité à l'acétate de sodium (0,3 M) / éthanol, lavé à l'éthanol 70%, séché puis resuspendu dans du tampon TE, pH 8,0.

Les sondes TAR radioactives sont obtenues par une transcription avec l'ARN polymérase T7 [Amersham Pharmacia Biotech] de 2µg d'ADN linéarisé en présence de 50 µCi α -³²P-CTP (ou UTP), 500 µM de rNTPs [sauf 100 µM CTP ou UTP froid selon le cas] et de tampon [40 mM Tris pH 7,9; 15 mM MgCl₂; 2 mM spermidine; 5 mM DTT] dans un volume de 50 µl pendant 1 h à 37°C. Le vecteur est par la suite

éliminé par traitement à la DNase I durant 15 minutes à 37°C. Les sondes sont extraites au phénol/chloroforme puis les rNTPs non incorporés sont éliminés par chromatographie d'exclusion sur Sépharose Séphadex G-50 [Amersham Pharmacia Biotech]. L'activité spécifique est déterminée selon le compte de P³² dans un compteur bêta et selon la quantité d'ARN récupéré estimée à partir de la densité optique à une longueur d'onde de 260 nm.

Les ARNm destinés à la traduction *in vitro* sont obtenus par une transcription avec la polymérase de phage [Amersham Pharmacia Biotech] Sp6 à partir de 10 µg d'ADN en présence de 500 µM ⁷mGpppG, 500 µM rNTPs [sauf GTP, 100 µM] et de tampon dans un volume de 50 µl pendant 1 h à 37°C, ce qui permet d'obtenir au-delà de 90% des transcrits avec une coiffe (Pelletier et Sonenberg, 1985). Les ARNm sont purifiés par digestion à la DNase I, extraits au phénol/chloroforme et finalement purifiés sur colonne d'exclusion Clonetech-400 (TE pH 8,0) ou Sépharose Séphadex G-50 [Amersham Pharmacia Biotech] afin d'éliminer les rNTPs non incorporés.

IV. NorthWestern

Les interactions ARN-protéines sont qualitativement étudiées par une liaison sur filtre de type NorthWestern. Brièvement, les protéine recombinantes sont exprimées dans une souche de *E. coli* BL21/pREP4 par induction à l'IPTG. Après induction, un échantillon d'extrait bactérien est analysé sur un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur membrane de nitrocellulose Protran [Mandel Scientific Ltd.]. La liaison sur filtre est effectuée comme décrit précédemment (Wickham et al., 1999) avec 2×10^5 cpm/ml de sonde d'ARN, dans du tampon de liaison [20mM Hepes, pH

8,0; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl; 1mM EDTA; 1 mM DTT]. Les filtres une fois lavés sont exposés pour autoradiographie pour la nuit.

V. Liaison en solution

Les interactions ARN-protéines sont quantitativement étudiées par une liaison en solution de HFBDQ purifiée et une sonde d'ARN radioactive tel que décrit (Wickham et al., 1999). Brièvement, HFBDQ purifiée est ajoutée en quantités croissantes à une quantité fixe d'ARN radioactif [20 000 cpm / tube] dans du tampon d'entreposage. Après incubation d'une demi-heure à température ambiante, les complexes ribonucléoprotéiques sont filtrés sur membrane poreuse de 45 μm [millipore] et les filtres sont lavés avec du tampon d'entreposage. Par la suite, la rétention de radioactivité sur le filtre est mesurée à partir du compte de cpm au compteur bêta.

Le maximum de rétention [100%] est identifié comme étant le nombre de cpm retenus en présence d'une quantité saturante en protéine, soit 10^{-6} nM (Wickham et al., 1999). Les courbes obtenues sont faites avec le logiciel GraphPad PRISM3 v.3.

VI. Traduction *in vitro*

Des lysats de réticulocytes de lapin [RRL] prétraités à la nucléase ont été achetés de Promega Corp. La traduction *in vitro* d'ARN a été conduite selon les recommandations du fabricant et selon les modifications apportées par Svitkin et al. (1994b). Chaque réaction de 12,5 μl contient 8,75 μl de lysat [70%], 5 mCi de méthionine[S³⁵] et l'ARN étudié. Les protéines recombinantes sont pré-incubées sur

glace avec le RRL en présence ou absence de 10 mM 2-AP tel qu'indiqué. La réaction est faite à 30°C, pendant 1 h, puis arrêtée par l'ajout de RNase A à une concentration finale de 0,2 M. Les produits de traduction sont analysés ou bien sur gel de polyacrylamide 10-12% et exposés pour autoradiographie ou bien analysés par essai immunologique ELISA.

VII. Tests ELISA

Des trousse de plaques de 96 puits ELISA enduites d'anticorps anti-CAT ainsi que toutes les solutions nécessaires à la mesure quantitative de protéine CAT soluble ont été achetées de Roche Diagnostic [Boehringer-Mannheim]. Les produits de réaction de traduction sont analysés selon les recommandations du fabricant et à une dilution spécifique afin de rester dans la portion linéaire de la courbe étalon : les produits de la traduction de l'ARN TARCAT sont dilués 1/20 ou 1/50 [2 AP], ceux de l'ARN CAT à 1/200 ou 1/400 [2 AP]. Les concentrations de la protéine CAT sont intrapolées à partir de la courbe étalon et servent à tracer les courbes avec le logiciel GraphPad PRISM3 v.3. Une concentration relative de CAT traduite de 100% correspond à une traduction obtenue sans l'ajout de protéine recombinante.

VIII. Essai d'activité hélicase de hStau

Le plasmide utilisé est pGEM-7Z coupé par l'enzyme *PvuII* (Hühn et al., 1997). L'ARN est par la suite obtenu avec une transcription par la Sp6 ou la T7 polymérase selon le protocole énoncé plus haut. Un brin d'ARN radioactif est obtenu par la transcription en présence de 50 μ Ci de [α -P³²]UTP. Les substrats sont obtenus

par l'hybridation, dans un volume de 100 μ l, des deux brins complémentaires [avec un excès molaire de 2-3 fois du brin non radioactif] dans du tampon d'hybridation [0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM PIPES, pH 6,4 et 80% (v / v) formamide] tel que rapporté (Hühn et al., 1997).

La réaction enzymatique a lieu dans un volume de 20 μ l contenant 1,5 μ l de substrat et 1 μ g de protéine recombinante dans du tampon de réaction [30 mM Tris-Cl; pH 7,5; 8 mM MgCl₂; 1,5 mM DTT; 30 μ g / ml BSA; 0,5 U / μ l RNaguard] et 2 mM ATP ou d'un autre ribonucléotide. La réaction est incubée 20 min à 37°C et arrêtée par l'ajout à une concentration finale de 0,3% SDS et 15 mM EDTA. Les produits de la réaction hélicase sont séparés sur un gel de polyacrylamide 10% sans gel d'entassement [*stacking gel*] et exposés pour autoradiographie toute la nuit.

RÉSULTATS

Résultats

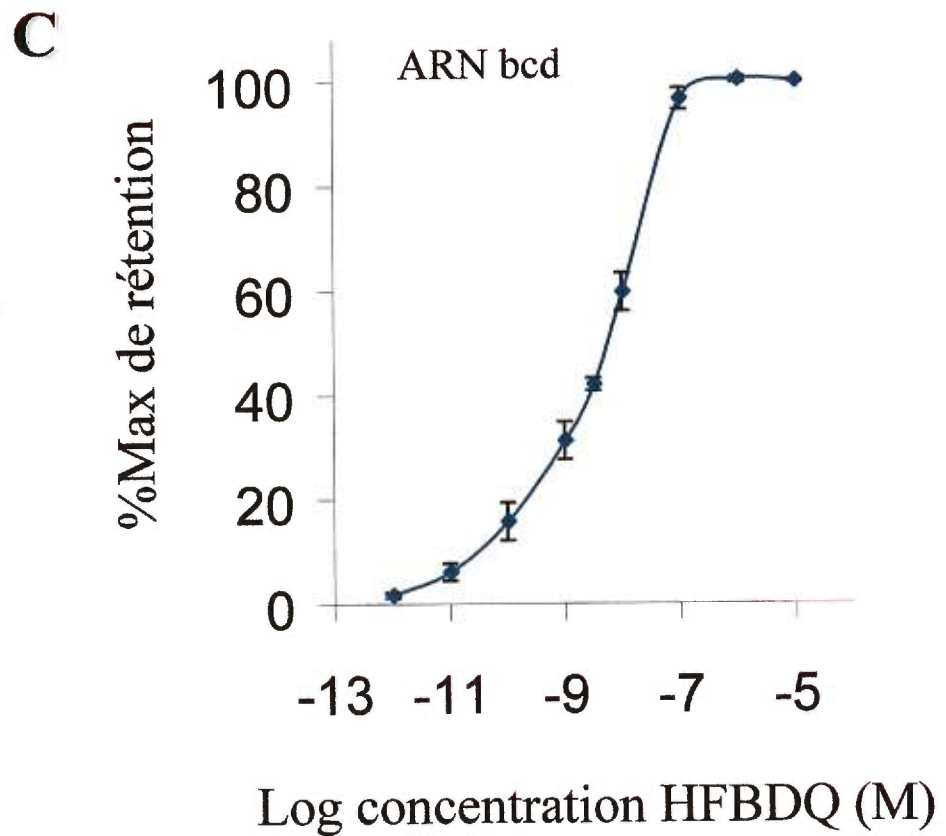
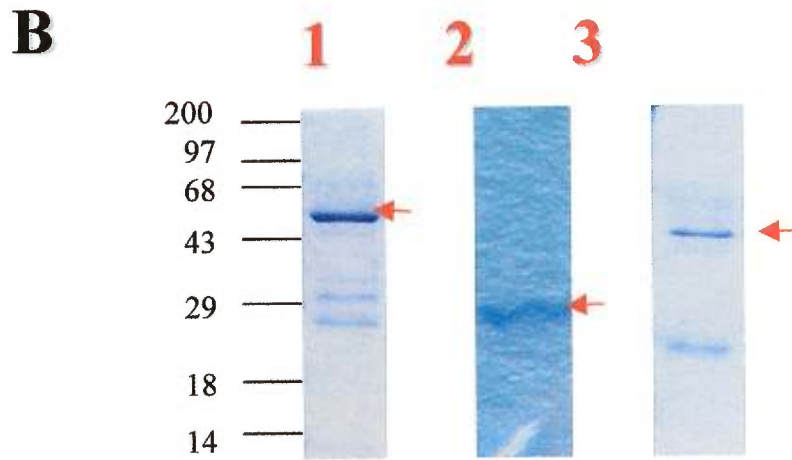
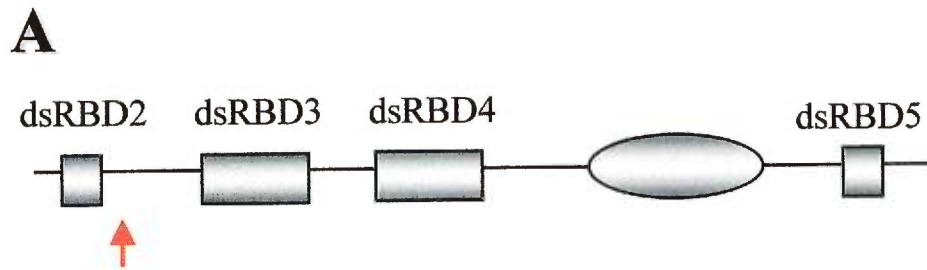
I. Purification du fragment protéique HFBDQ

Avant de vérifier l'hypothèse qui propose que la protéine humaine Staufen posséderait un effet sur la traduction, nous avons tout d'abord procédé à l'optimisation d'un protocole de purification du fragment protéique HFBDQ. Ce fragment, plutôt que la protéine complète, est utilisé lors des essais de traduction afin d'améliorer les rendements de purification. En effet, des résultats préliminaires démontrent qu'une plus grande quantité de protéine soluble est obtenue avec le fragment HFBDQ plutôt qu'avec la protéine complète. La séquence de l'ADNc de HFBDQ débute au site *Bam*HI endogène, situé en 3' de la fin de la séquence du domaine consensus dsRBD2 [schéma 5, p.47 et figure 1A], et code pour 6 histidines en N-terminal de la protéine Staufen.

La purification sur colonne d'affinité Ni-NTA [Qiagen] permet d'obtenir une préparation de protéine de fusion qui présente 6 histidines en N-terminal. Les protéines de fusion [6xHis]HFBDQ, [6xHis]La et [6xHis]NEP sont purifiées sous les mêmes conditions et selon le même protocole. Ce qui nous permet de postuler que l'effet observé sur la traduction *in vitro* lors de l'ajout de préparations de protéines repose sur des caractéristiques intrinsèques et spécifiques aux dites protéines et non à un contaminant issue du protocole. Le contrôle positif utilisé est l'autoantigène La et le contrôle négatif est la métallopeptidase NEP. Dans les RRL, la protéine La stimule la traduction d'ARN qui possèdent des séquences virales (Svitkin et al., 1994a et 1994b) et NEP ne possède pas d'effet sur la traduction.

Figure 1. La protéine HFBDQ recombinante purifiée est susceptible de lier de l'ARNdb en solution

- A) Le fragment protéique HFBDQ est codé par l'ADNc partiel humain de Staufen qui débute au site endogène *Bam*HI et se termine à son extrémité 3' endogène. Les boîtes représentent les séquences consensus de liaison à l'ARNdb [dsRBD] qui sont numérotés de façon à respecter l'ordre présent dans la protéine de drosophile. L'ovale représente la séquence minimale de liaison à la tubuline *in vitro*.
- B) Analyse par coloration au bleu de Coomassie d'un gel de polyacrylamide 10% d'un échantillon de la préparation de protéines bactériennes éluées sur colonne Ni-NTA en conditions dénaturantes. À gauche sont indiqués les M_r des marqueurs moléculaires, ensuite viennent les échantillons de protéine HFBDQ, NEP et La [flèches rouges].
- C) Une préparation de HFBDQ purifiée par Ni-NTA en conditions dénaturantes est capable, après élimination des agents dénaturants, de lier de l'ARNdb en solution. La sonde d'ARN utilisée est la séquence minimale du 3'UTR de l'ARNm *bicoid* de drosophile. Les complexes RNP sont filtrés et la quantité de radioactivité retenue sur le filtre est quantifiée par compteur bêta. La radioactivité retenue est proportionnelle à la quantité d'ARN liée par la protéine. 100% Max de rétention consiste en la quantité maximale de rétention d'ARN en présence d'une concentration saturante en protéine.



Des échantillons des purifications des protéines HFBDQ, NEP et La sont analysés sur gel de polyacrylamide par coloration au bleu de Coomassie {figure 1B}. Des fragments plus petit qu'une $M_r < 29$ kDa co-éluent avec les protéines de $M_r = 45$ kDa La et HFBDQ, mais ils ne sont pas un obstacle à la spécificité de l'essai de traduction puisqu'ils sont éliminés durant l'étape de changement de tampon sur Centriprep 30 kDa [Amicon] .

Afin d'éliminer les sels et les dénaturants et ainsi favoriser le repliement natif des protéines purifiées, nous avons essayé plusieurs protocoles. La dialyse s'est avérée désastreuse : un nuage de protéine HFBDQ précipitée est observable à l'œil nu. Le changement graduel de tampon effectué directement sur la colonne Ni-NTA n'a pas fourni de meilleurs résultats que la dialyse : très peu de protéine est récupérée après l'étape d'élution ce qui suggère, croit-on, que la protéine précipite dans la colonne. Un essai de repliement des protéines basé sur des principes reconnus pour améliorer le repliement *in vitro* [voir les chapitres Matériel et Méthodes, et Discussion] a été utilisé et c'est celui qui a fourni les meilleurs rendements : à partir d'une culture de 250 ml on obtient entre 50 - 100 μg de protéine purifiée à une concentration de 0,5 - 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Puisqu'aucune activité biologique n'est connue pour la protéine humaine Staufen, un essai de liaison à de l'ARNdb en solution est entrepris afin d'apprécier le repliement natif d'une préparation de HFBDQ. Cet essai ne peut prétendre fournir d'informations sur la conformation de la protéine entière, mais du moins il suggère que le domaine dsRBD3, responsable de la liaison à l'ARNdb, est replié de façon native (Wickham et al., 1999; Ramos et al., 2000). Une liaison positive et dans les Kd attendue suggère que l'échantillon contient de la protéine HFBDQ native.

À la figure 1C , on observe le résultat d'un essai de liaison en solution entre une sonde d'ARN et de la protéine HFBDQ purifiée et soluble. La sonde d'ARN

consiste en la séquence minimale du 3'UTR de l'ARNm *bcd*, marquée au P³², reconnue pour interagir *in vitro* avec HFBDQ (Wickham et al., 1999). Lors de cet essai, les complexes ribonucléoprotéiques formés sont filtrés et la radioactivité retenue sur le filtre est une indication de l'affinité de la protéine pour la sonde d'ARN. L'analyse d'un graphique dans lequel sont rapportées les valeurs de trois expériences indépendantes indique que HFBDQ lie la sonde d'ARN *bcd* avec un Kd de 10⁻⁸ M, ce qui est relativement plus faible que ce qui était attendu [Kd de 10⁻⁹ M; Wickham et al., 1999]. Ceci suggère qu'une fraction de la quantité de protéine estimée par essai de quantification BioRAD n'est pas dans une conformation native.

II. Optimisation de la réaction de traduction dans des RRL

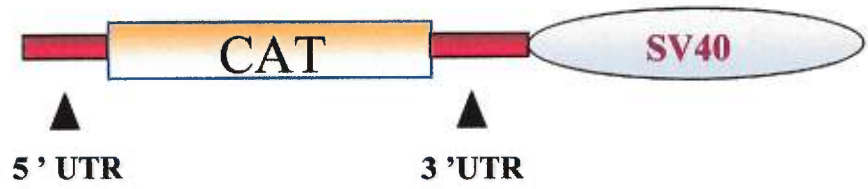
Des études génétiques chez la drosophile suggèrent que la protéine Staufén peut agir au niveau de la dépression de la traduction de transcrits transportés; un effet éventuel dans des RRL pourrait alors être la stimulation de la traduction d'ARN réprimé. Afin de pouvoir observer une stimulation potentielle de la traduction, nous avons déterminé à quelle concentration d'ARN dans les RRL on peut obtenir un taux de traduction non saturant.

Un ARN possédant une coiffe est transcrit à partir du plasmide pSP64CAT [ARN CAT]{figure 2A}, puis des quantités croissantes d'ARN sont traduites dans des RRL [volume final de 12,5 µl]. Par la suite, le taux de traduction est évalué par essai immunologique ELISA anti-CAT. Le graphique de la quantité de protéine CAT traduite en fonction de la quantité d'ARN génère une hyperbole {figure 2C} qui s'approche d'un plateau, signe de la saturation du système, vers la valeur de 1 µg d'ARN.

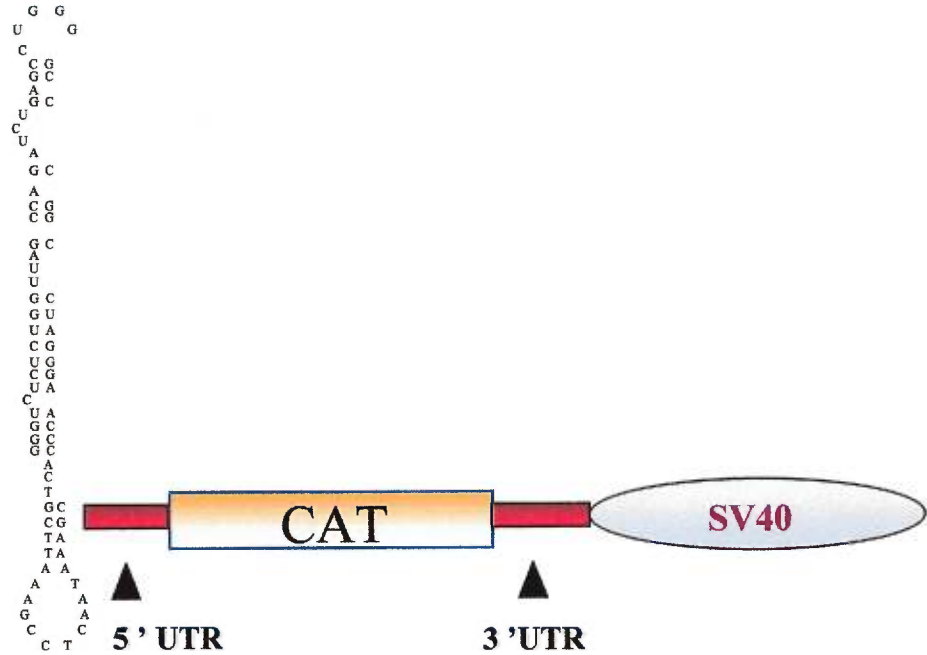
Figure 2. La séquence TAR réprime la traduction *in vitro* du gène rapporteur CAT

- A) Représentation schématique de l'ARN CAT qui consiste en le 5'UTR endogène, la séquence codante pour le gène rapporteur CAT, suivit du 3'UTR endogène et de la séquence de SV40 contenant le signal pour la polyadénylation *in vivo*.
- B) Représentation schématique de l'ARN TARCAT identique à l'ARN CAT, mais en plus cet ARN-ci contient à son extrémité 5' la séquence TAR du HIV-1 [+1 à +80] dont l'ARN adopte en solution une structure secondaire stable en tige-boucle avec protubérance.
- C) La séquence TAR introduite en 5' d'un transcrit rapporteur CAT inhibe la traduction dans des RRL. La concentration en protéine CAT est déterminée par essai ELISA. La traduction de l'ARN TARCAT correspond à la courbe rouge et celle de l'ARN CAT à la bleue. Ce résultat a été reproduit trois fois, les SEM sont représentés par des barres au dessus et en dessous des points.

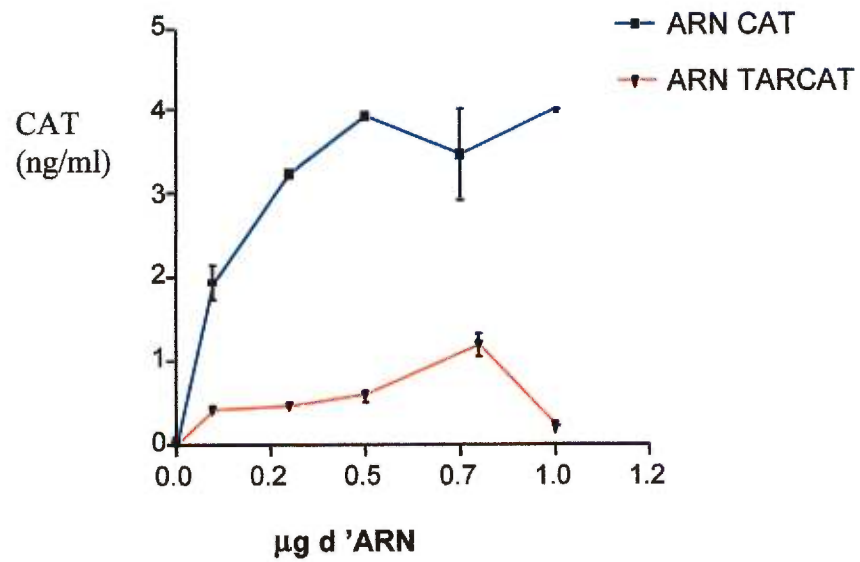
A



B



C



Un ARN possédant une coiffe est transcrit à partir du plasmide pSP64TARCAT [ARN TAR CAT] {figure 2B}. Cet ARN débute par la séquence TAR [+1 à +80] du HIV-1. Des quantités croissantes de cet ARN sont traduites dans des RRL [volume final de 12,5 µl], puis le taux de traduction est évalué par essai ELISA anti-CAT. Le graphique de la concentration de protéine CAT traduite en fonction de la quantité d'ARN TARCAT démontre en chaque points de la courbe, un taux de traduction plus faible que pour une quantité identique d'ARN CAT {figure 2C}. La répression de la traduction varie selon la quantité d'ARN utilisée (figure 2C et Svitkin et al., 1994b). Afin d'utiliser une quantité d'ARN CAT et TARCAT qui ne soit pas saturante, nous avons choisi, pour tous les essais de traductions suivants, une quantité d'ARN de 50 ng [concentration finale de 3,98 µg / ml].

III. Dans des RRL, HFBDQ *trans*-active la traduction de messagers réprimés

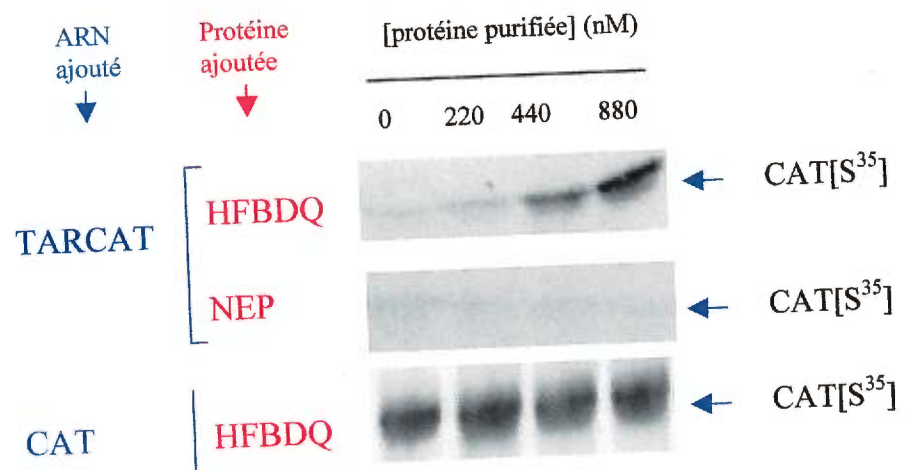
Une concentration d'ARN non-saturante est traduite dans des RRL auxquels sont ajoutées des quantités croissantes d'une préparation soluble du fragment protéique HFBDQ. Dans un essai de traduction en présence de Mét[S³⁵], on observe par autoradiographie deux type d'effets. En premier lieu, l'ajout de Staufen stimule la traduction de l'ARN TARCAT de façon proportionnelle à la quantité de protéine ajoutée [facteur maximal de 15 fois] {figure 3B}. Cet effet est spécifique à l'ajout de HFBDQ : aucun effet n'est observé lors de l'ajout de protéine NEP recombinante purifiée et solubilisée dans les mêmes conditions {figure 3B}. Une stimulation est également observé lors d'ajout de l'autoantigène recombinant La {résultat non montré}, effet rapporté par l'équipe de Sonenberg (Svitkin et al., 1994b). En deuxième lieu, peu ou pas de stimulation est observée lors de l'ajout de HFBDQ à un essai de

traduction de l'ARN CAT [facteur maximal de 1,5 fois] {figure 3B}. Ces résultats sont corroborés par des essais de type ELISA.

Ces résultats suggèrent que dans des RRL, HFBDQ influence la traduction de l'ARN de la Chloramphénicol acétyl transférase bactérienne de deux façons : elle stimule la traduction lorsque la séquence TAR du HIV-1 est présente à l'extrémité 5' du transcrit et ne l'affecte pas lorsque cette séquence est absente. Ces résultats suggèrent que l'effet de HFBDQ sur la traduction n'est pas général, mais affecte plutôt un aspect du mécanisme de répression de la traduction généré par la séquence TAR.

Figure 3. HFBDQ stimule la traduction dans des RRL de façon dose-dépendante

Dans les deux panneaux du haut, on trouve les autoradiogrammes des produits de la traduction de l'ARN TARCAT en présence de quantités croissantes de protéine HFBDQ ou NEP, puis dans celui du bas, l'autoradiogramme de la traduction de l'ARN CAT en présence quantités croissantes de HFBDQ. Les flèches bleues indiquent l'emplacement de la protéine CAT marquée au S^{35} . Des échantillons des produits de traduction sont analysés sur gel de polyacrylamide 10% puis le gel est exposé toute la nuit.



IV. L'effet de HFBDQ sur la traduction n'est pas le fruit d'une inhibition de l'activité catalytique de la PKR

Tel que décrit dans l'introduction, la structure secondaire qu'adopte l'ARN TAR génère des segments d'ARNdb qui activent la kinase PKR et ainsi répriment la traduction [section V.5.C.]. Puisque HFBDQ possède une haute affinité pour de l'ARNdb, il est possible que la *trans*-activation de la traduction dans les RRL soit due à une compétition entre HFBDQ et la PKR pour le substrat TAR. Afin d'examiner une telle hypothèse, des RRL dépourvus d'activité kinase PKR ont été générés par l'ajout de 10 mM de 2-aminopurine [2-AP] (Williams et al., 1979). L'ajout d'une telle concentration de 2-AP, une drogue qui inhibe les sérine / thréonine kinases, inhibe dramatiquement l'activité catalytique de PKR *in vitro* et *in vivo* (Sengupta et al., 1990; Hu et Conway, 1993; Katze et al., 1991; Marcus et Sekellick, 1988).

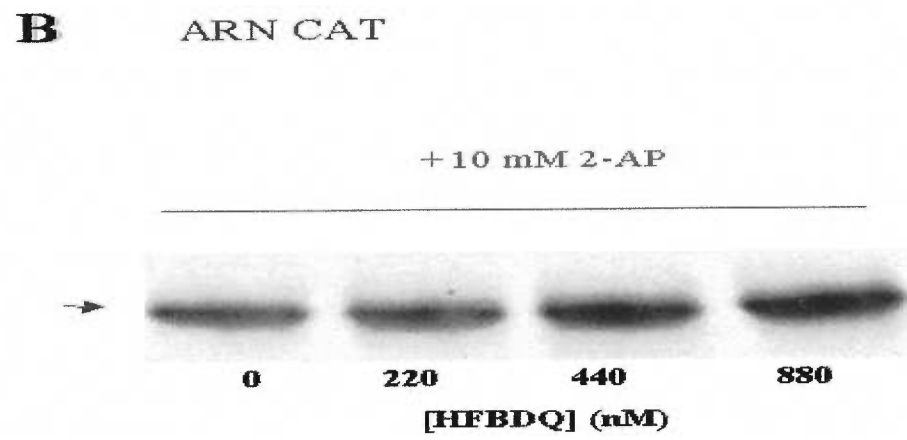
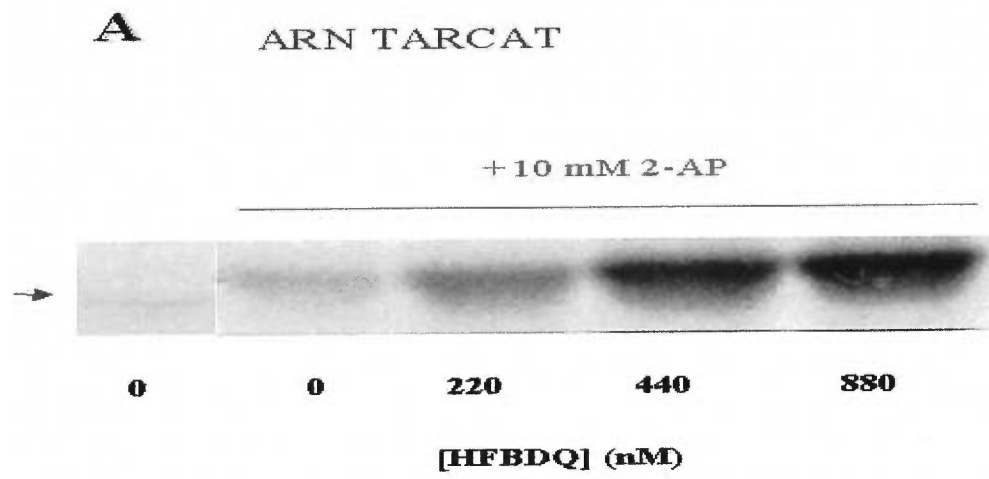
En premier lieu, l'autoradiographie d'un essai de traduction de l'ARN TARCAT en présence de Mét[S³⁵] et de 2-AP démontre que le taux basal de traduction est augmenté de 3 fois {figure 4 piste 1}; l'activité kinase PKR est effectivement réprimée. En deuxième lieu, l'ajout de HFBDQ aux essais de traduction en présence de 2-AP des ARN TARCAT et CAT démontre le même genre d'effet qu'en absence de 2-AP {figure 3}. En effet, malgré l'inhibition de l'activité PKR par l'agent pharmacologique 2-aminopurine, l'ajout de Staufen persiste à stimuler la traduction de l'ARN TARCAT de façon proportionnelle à la quantité de protéine ajoutée [facteur maximal de 15 fois] et peu ou pas de stimulation est observée pour la traduction de l'ARN CAT [facteur maximal de 1,5 fois] {figure 3B}. Ces résultats sont corroborés par des essais de type ELISA.

Figure 4. HFBDQ stimule la traduction par une voie indépendante de l'activité kinase PKR

Une traduction en présence de Mét-[S³⁵] est entreprise dans des RRL sans activité PKR par l'ajout de 2-AP, une drogue qui inhibe les sérine / thréonine kinases. Des échantillons des produits de réaction sont analysés sur gel de polyacrylamide 10% puis le gel est exposé toute la nuit.

A) À la piste 1, traduction de l'ARN TARCAT en absence de 2-AP et de HFBDQ; pistes 2 à 5, traduction de l'ARN TARCAT en présence de 2-AP et de quantités croissantes de HFBDQ.

B) Traduction de l'ARN CAT en présence de 2-AP et de quantité croissantes de HFBDQ.



Ces résultats suggèrent que HFBDQ stimule la traduction lorsque la séquence TAR du HIV-1 est présente à l'extrémité 5' du transcrit par un mécanisme qui est indépendant de l'activité catalytique de la PKR.

V. Les pré-requis structuraux de la tige-boucle de l'ARN TAR essentiels pour la liaison à la kinase PKR ne sont pas les mêmes que pour HFBDQ

Une hypothèse plausible qui expliquait la stimulation de la traduction observée lors de l'ajout de HFBDQ était une compétition entre Staufen et PKR pour des substrats d'ARNdb. En effet, HFBDQ peut lier de l'ARNdb {figure 1C} et l'activité kinase PKR dépend de déterminants d'ARNdb de la structure secondaire de l'ARN TAR (). Cependant, cette hypothèse semble fautive puisque l'inhibition de l'activité kinase PKR par le 2-AP n'affecte pas la stimulation de la traduction observée lors de l'ajout de HFBDQ. L'explication logique serait que les éléments de la structure TAR essentiels pour l'activation de la kinase PKR ne soient pas liés par HFBDQ.

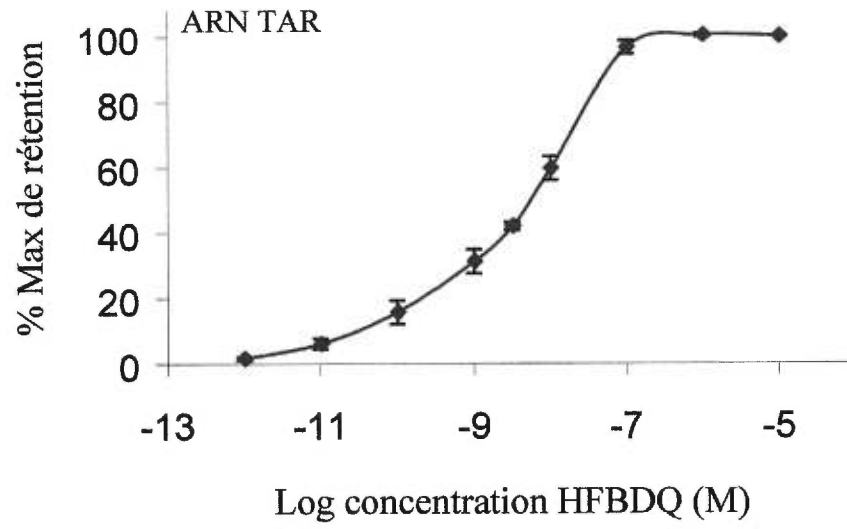
Afin d'examiner cette hypothèse, un essai de liaison en solution a été entrepris afin d'évaluer l'affinité de liaison de HFBDQ pour l'ARN TAR. Une sonde radioactive d'ARN TAR est transcrite en présence de [α -P³²] CTP et utilisée dans des essais de liaison. Tel qu'observé à la figure 5A, la protéine recombinante HFBDQ purifiée et soluble présente une haute affinité pour l'ARN TAR [séquence +1 à +60] avec un Kd près de celui observé pour la sonde *bcd* {figure 1C}.

Afin d'identifier les déterminants qui influencent cette liaison, des essais de compétition de liaison ont été effectués par buvardage de type North-Western (Wickham et al., 1999). L'ajout croissant d'excès molaire d'ARNdb synthétique non

Figure 5. Le fragment protéique HFBDQ lie l'ARN TAR et cette liaison dépend de déterminants d'ARNdb

A) Essai de compétition de liaison par buvardage de type North-Western [voir Matériel et Méthodes] où chaque filtre est incubé avec la même quantité d'activité spécifique de sonde d'ARN TAR marquée au P³² en présence ou non d'excès molaires d'ARN synthétique.

A



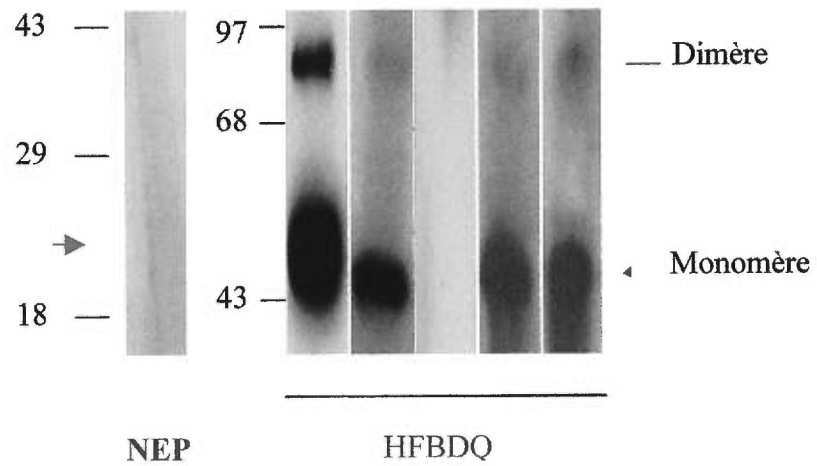
B

Compétiteur non-radioactif

I / C

-	-	10	1000	-	-
-	-	-	-	10	1000

C



marqué poly (I) / poly (C) diminue dramatiquement la quantité d'ARN TAR radioactif associée à HFBDQ, alors que l'ajout croissant d'excès molaire d'ARN simple brin poly (C) n'a que très peu d'effet {figure 4B}. Bien qu'il semble qu'entre le filtre contrôle et les autres il y ait une différence de liaison, cette différence est due à une exposition inégale. Ces résultats suggèrent que HFBDQ lie l'ARN TAR et que cette liaison dépend de déterminants d'ARNdb.

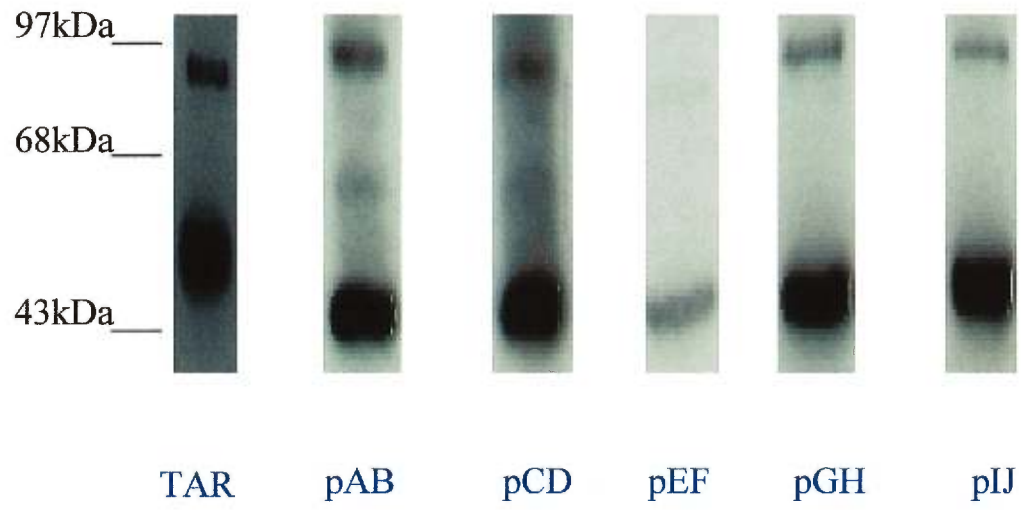
La structure secondaire qu'adopte l'ARN TAR en solution peut être divisée en différents segments : des tiges d'ARNdb, une protubérance et une boucle. Afin d'évaluer la contribution des différents segments de cette structure secondaire pour l'association avec HFBDQ, des essais de liaison ont été fait avec des sondes TAR mutantes. À la figure 6A, on observe des mutations ponctuelles [flèches bleues] ou des délétions [lignes noires] qui ont pour but de modifier soit la structure secondaire soit la séquence primaire de l'ARN TAR. Elles sont inspirées d'études précédentes et affectent la viabilité du virus *in vivo* ou bien la liaison *in vitro* de l'ARN TAR à des protéines cellulaires ou virales (Gatignol et al., 1991; Chen et al., 1994; Harrich et al., 1994; Rounseville et al., 1992).

Des mutations ponctuelles introduites dans la séquence de la boucle [pCD], dans un [p49AB] ou les deux brins complémentaires [p49] de la tige inférieure ou dans la protubérance ne perturbent pas la liaison avec HFBDQ {figure 6B et tableau 4}. La délétion de la protubérance [pGH] ou d'un seul brin de la tige inférieure [p52] n'affecte pas non plus de façon significative la liaison *in vitro* de l'ARN TAR avec HFBDQ. Cependant, le fragment protéique HFBDQ lie avec moindre affinité une structure TAR dans laquelle l'hélice supérieure d'ARNdb entre la protubérance et la boucle est détruite [pEF] {figure 6B et tableau 4}. Ces résultats suggèrent que les pré-requis structuraux de l'ARN TAR essentiels pour l'activité kinase de PKR [figure 6A, encadré jaune] ne sont pas les mêmes que pour la liaison de HFBDQ et corroborent

Figure 6. Les pré-requis structuraux de la tige-boucle de l'ARN TAR essentiels pour la liaison à la kinase PKR ne sont pas les mêmes que pour HFBDQ

- A) Structures secondaires prédites par programme informatique (RNADraw) des différents mutants TAR [séquence +1 à +60]. Les flèches bleues indiquent des mutations ponctuelles, les traits noirs indiquent des délétions. Le rectangle rouge indique le segment d'ARNdb essentiel pour la liaison à la kinase PKR.
- B) Buvardage de type North-Western où chaque filtre est incubé avec la même quantité d'activité spécifique des différentes sondes d'ARN TAR marquée au P³².

B



l'hypothèse qui suggère que la stimulation de la traduction de l'ARN réprimé TARCAT soit la résultante d'un mécanisme indépendant de PKR.

VI. L'effet de HFBDQ sur la traduction n'est pas le résultat d'une activité hélicase intrinsèque

Le mécanisme par lequel HFBDQ stimule la traduction de l'ARN TARCAT est inconnu. Une hypothèse possible implique une activité hélicase associée à HFBDQ qui détruirait les structures présentes dans l'ARN TAR et faciliterait ainsi le balayage du 5'UTR ou l'accès à la coiffe. En effet, pour certaines protéines hélicases, la présence de dsRBD est essentielle à l'activité catalytique (Gibson et Thompson, 1994) et le fragment protéique HFBDQ en possède trois. Afin d'examiner cette hypothèse, un essai d'activité hélicase est entrepris (Hühn et al., 1997) avec le fragment protéique HFBDQ.

Dans un tel essai, on observe sur gel de polyacrylamide le déenroulement d'une hélice d'ARN hybride constituée d'un brin radioactif et d'un brin complémentaire non radioactif. Le substrat d'ARNdb est incubé avec de la protéine recombinante soluble puis en présence d'activité hélicase, le brin radioactif est libéré du substrat et migre alors plus vite. Le substrat d'ARNdb utilisé est constitué d'un brin marqué au P³² de 181 nucléotides et d'un brin non radioactif de 271 nucléotides. Après hybridation, ces deux brins forment un segment d'ARNdb de 70 paires de bases et deux brins qui font saillie en 3' de 201 et 111 nucléotides (figure 7A).

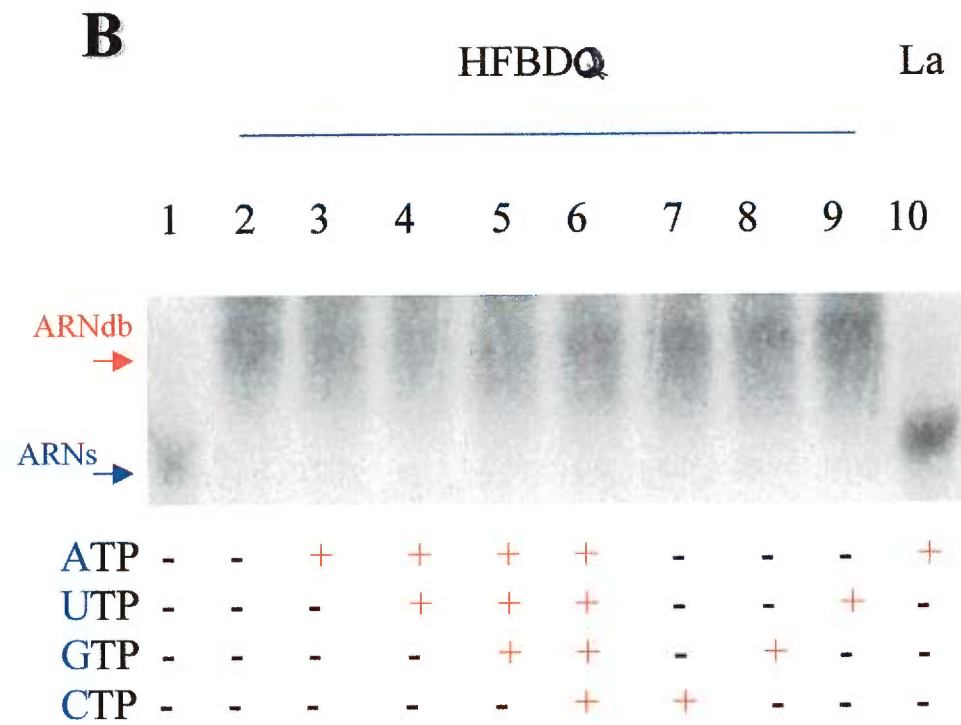
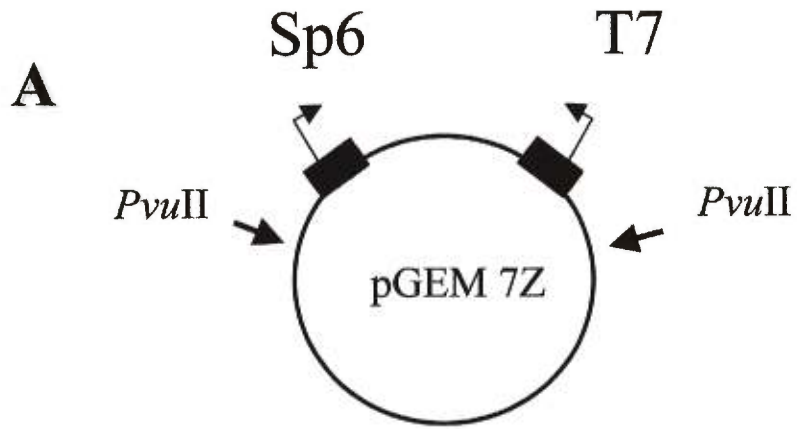
On peut observer à la figure 7B piste 1 le substrat dénaturé par la chaleur. À la piste 10, se trouve la réaction contrôle où le substrat est incubé avec la protéine hélicase La (Hühn et al., 1997) en présence de 2 mM ATP. De la piste 2 à la piste 9, le substrat est incubé avec 1 µg de HFBDQ en présence d'un nucléotide ou d'une

combinaison de différents ribonucléotides. Ces ribonucléotides servent généralement de source d'énergie pour l'activité hélicase et leur nature peut influencer la spécificité de la réaction : en présence d'ATP la protéine La désenroule l'ARNdb et le grand antigène T du virus SV40 désenroule l'ADNdb; en présence d'un autre nucléotide [UTP, GTP ou CTP] la protéine La ne présente plus aucune activité hélicase et le grand antigène T désenroule dorénavant uniquement un substrat d'ARNdb (Hühn et al., 1997; Scheffner et al., 1989).

Cependant, malgré les différentes conditions utilisées, aucune activité hélicase n'est associée à la préparation de HFBDQ. Étant donné qu'il s'agit de la même préparation que celle employée lors des essais de traduction dans des RRL, cela suggère que la stimulation de la traduction observée n'est pas le résultat d'une activité hélicase associée à la préparation de HFBDQ.

Figure 7. HFBDQ ne possède pas d'activité hélicase associée

- A) Synthèse du substrat d'ARNdb pour l'essai d'activité hélicase. Les ARN sont obtenus par la transcription du plasmide pGEM-7Z digéré par PvuII. Le substrat d'ARNdb utilisé est constitué d'un brin marqué au P³² de 181 nucléotides et d'un brin non radioactif de 271 nucléotides qui après hybridation forment un segment ARNdb de 70 paires de bases et deux brins qui font saillie en 3' de 201 et 111 nucléotides.
- B) Autoradiogramme d'un gel de polyacrylamide 10% d'un essai d'activité hélicase. À la hauteur de la flèche rouge on retrouve le substrat d'ARN double brin et la hauteur de la flèche bleue, le substrat d'ARN simple brin. À la piste 1 : le substrat est dénaturé par la chaleur. À la piste 10 : la réaction contrôle où le substrat est déenroulé par l'incubation avec la protéine La en présence de 2 mM ATP. À la piste 2, 1 µg de HFBDQ en absence de nucléotide co-facteur. De la piste 3 à la piste 9 respectivement, 1 µg de HFBDQ en présence de 2 mM de : ATP; ATP et UTP; ATP, UTP et GTP; ATP, UTP, GTP et CTP; CTP; GTP; UTP.



DISCUSSION

Discussion

I. Rôle potentiel de *Staufen* dans la traduction chez les mammifères

Chez la drosophile, des études génétiques ont démontré que *Staufen* est un gène important pour l'expression asymétrique de certains ARNm durant l'ovogenèse et l'embryogenèse : des ovocytes issues de femelles homozygotes pour des mutations dans ce gène ont des défauts de développement imputables à une localisation ainsi qu'à une traduction aberrante de ces ARNm [voir la section : Introduction VI, p.70].

Chez les mammifères, la protéine Stau colocalise avec des marqueurs du réticulum endoplasmique [ER] (Wickham et al., 1999; Marión et al., 1999) qui est une structure où l'on retrouve une forte activité de synthèse polypeptidique. De plus, la protéine cosédimente dans un gradient de saccharose avec des polysomes et est associée à un immunoprécipité de protéines ribosomales (Marión et al., 1999; Luo et DesGroseillers, communication personnelle). Dans les dendrites de neurones en culture, la protéine *Staufen* colocalise avec le réticulum endoplasmique, avec des microtubules et avec des complexes ribonucléoprotéiques qui contiennent de l'ARNm, des ribosomes et des facteurs de traduction (Kiebler et al., 1999; Knowles et al., 1996). De plus, ces complexes ribonucléoprotéiques se déplacent dans les dendrites de façon antéro- et rétro- grade (Köhrmann et al., 1999).

L'ensemble de ces observations suggère l'hypothèse que chez les mammifères *Staufen* est une protéine impliquée dans la régulation spatio-temporelle de l'expression de certains ARNm.

II. La protéine humaine Staufen stimule la traduction d'un ARN réprimé

Afin d'évaluer l'effet de Staufen sur la traduction chez les mammifères, nous avons élaboré un essai *in vitro* dans des RRL où nous pouvions suivre le taux de traduction de certaines quantités d'ARN spécifiques par deux techniques différentes. Les techniques utilisées sont l'incorporation de Mét[S³⁵] dans la protéine traduite et l'essai immunologique ELISA. Ces deux techniques ont fourni des résultats similaires. Les ARN utilisés n'ont comme différence que la présence ou non à leur extrémité 5' de la séquence TAR [+1 à +80] du HIV-1. L'ARN de cette séquence adopte en solution une structure secondaire stable en forme de tige-boucle avec protubérance qui réprime la traduction dans les RRL.

À la figure 2, nous avons choisi une quantité d'ARN dans la portion linéaire de la courbe qui décrit le taux de synthèse en fonction de la quantité d'ARN. À la figure 3, nous démontrons que l'ajout de quantités croissantes de HFBDQ à cette quantité d'ARN ne permet de stimuler que la traduction de l'ARN qui est réprimée par la séquence TAR.

À la figure 4, nous démontrons que dans des RRL sans activité PKR l'ajout de Staufen persiste à stimuler la traduction de l'ARN réprimé par la séquence TAR. À la figure 5, des essais de liaison *in vitro* sur membrane [NorthWestern] ou en solution ont permis de démontrer que Staufen peut lier l'ARN TAR et que cette liaison est dépendante de composantes d'ARNdb. À la figure 6 ainsi que dans le tableau 4, nous observons que l'intégrité de l'hélice d'ARNdb entre la boucle et la protubérance est essentielle à la liaison avec HFBDQ; élément qui n'est pas essentiel pour l'activation de PKR.

À la figure 7, nous démontrons que Staufen ne possède pas d'activité hélicase nucléotide dépendante. L'ensemble de nos résultats suggèrent que Staufen stimule la traduction de l'ARN réprimé par la séquence TAR selon un mécanisme qui serait indépendant de l'activité kinase PKR ou d'une activité hélicase associée.

III. Le choix de la séquence TAR comme élément de répression de la traduction

Le but de cet étude est d'examiner l'hypothèse selon laquelle la fonction biologique de la protéine humaine Staufen est d'agir au niveau de la modulation de certains ARN messagers; pourquoi alors choisir deux types d'ARN et surtout pourquoi la séquence TAR?

Comme exposé dans la section Introduction, durant le transport de l'ARN la synthèse peptidique est régulée de façon spatio-temporelle : l'expression localisée de certaines protéines étant garante de leur fonction. Chez la drosophile, des éléments *cis* dans le 3' et 5' UTR de l'ARNm *osk* sont responsables de la régulation de la traduction durant le transport. Des facteurs qui reconnaissent ces éléments peuvent agir *in trans* et être responsables de la dite régulation. Bien que certains de ces facteurs soient connus et que certains indices suggèrent un rôle pour Staufen, les détails du mécanisme restent obscurs. Ainsi, puisque nous ne connaissons pas tous les intervenants de ce mécanisme, nous ne pouvions choisir d'utiliser les séquences de l'ARNm *osk* dans notre approche expérimentale.

Bien qu'aucune donnée expérimentale ne suggère qu'un ARN qui porte la séquence TAR du HIV-1 à son extrémité 5' soit sous une régulation de la traduction commune à celle retrouvée dans le transport d'ARNm, il reste que ce type d'ARN n'est pas traduit de façon efficace. Ainsi, l'utilisation de deux ARN identiques en tous

points sauf pour la présence de la séquence TAR à l'extrémité 5' de l'un deux permet d'étudier : (1) un rôle pour Staufen dans la traduction et (2) la capacité de Staufen de stimuler la traduction réprimée d'un transcrit.

IV. Le choix du système des RRL

Une étude *in vitro* possède la caractéristique, qui selon la question posée peut être un avantage ou un défaut, de laisser à l'expérimentateur la liberté de contrôler certaines variables. Dans notre cas, nous avons ainsi pu déterminer la quantité d'ARN désirée, les concentrations des différents sels présents, les isoformes de protéines Staufen humaines présentes, etc. Comme système de traduction *in vitro*, nous avons entre autre le choix des RRL, des extraits de cellules humaines et de l'extrait de germe de blé. La répression de la traduction induite par la séquence TAR est minimisée dans le dernier système dû au fait qu'il ne possède pas d'activité PKR endogène et ne présente pas de dépendance pour la coiffe. La facilité pour obtenir commercialement des RRL a fait pencher la balance et nous l'avons préféré vs l'extrait de cellules humaines.

Cependant, un défaut commun à tous ces systèmes est qu'un système acellulaire ne possède pas toutes les composantes impliquées dans le processus de localisation de l'ARN. Parmi ceux-ci, notons le cytosquelette, les protéines motrices et les composantes des complexes RNP responsables du transport. Aussi, on se retrouve dans une situation où l'effet de HFBDQ sur la traduction est isolé des composantes qui *in vivo* pourraient soit réguler l'activité de Staufen sur la traduction soit celle d'autres composantes associées à la traduction.

V. Une méthode pour obtenir de la protéine purifiée et soluble

Une protéine recombinante purifiée et soluble est essentielle afin de déterminer qu'un effet observé sur la traduction *in vitro* est spécifique. Pour ce faire, la méthode de purification par affinité Ni-NTA permet de purifier les protéines recombinantes qui possèdent 6xHis à une extrémité. La coloration au bleu de coomassie d'un gel de polyacrylamide sur lequel sont séparés des échantillons de la purification permet d'estimer la pureté de la préparation de protéines à > 90% {figure 1}.

Afin d'évaluer la spécificité de l'effet observé sur la traduction, nous avons employé, outre HFBDQ, deux autres protéines recombinantes : l'autoantigène La et la métallopeptidase NEP. Un rôle dans la stimulation de la traduction d'ARN possédant la séquence TAR à l'extrémité 5' a été rapporté pour La (Svitkin et al., 1994b), mais aucun rôle dans la traduction n'est connu pour NEP; La est donc le contrôle positif et NEP, le contrôle négatif.

Une difficulté technique a consisté en l'étape du changement de tampon de la préparation de protéine purifiée. En effet, Staufen est peu soluble et se retrouve dans les corps d'inclusion lorsque surexprimée chez *E. coli*. Sa purification s'est donc effectuée en présence de dénaturants [le GuHCl et l'urée]. Une étape de changement de tampon s'avère donc être essentielle afin d'obtenir une protéine biologiquement active. Cette étape s'est avérée problématique : Staufen est sujette à la précipitation. L'emploi d'un fragment protéique, nommé HFBDQ, a permis d'améliorer le rendement de récupération sans toutefois le régler sans équivoque.

Dans la majorité des cas, afin d'éliminer l'urée 8M [l'agent dénaturant] on procède par dialyse en paliers décroissants de concentration en urée. Cette approche n'est cependant pas applicable pour HFBDQ; un nuage de précipité, visible à l'œil nu, se forme à des concentrations intermédiaires de 2-4 M d'urée. une autre méthode

consiste à changer graduellement le contenu du tampon de la préparation de protéine directement sur la colonne de purification avant d'éluer la protéine. Cette méthode n'a toutefois pas amélioré les rendements : très peu ou pas du tout de protéine est récupérée par cette méthode.

Nous avons, par essais et erreurs, établi un protocole de repliement de la protéine qui permet d'obtenir suffisamment de protéine [100-150 µg / 250 ml culture] à une concentration satisfaisante pour les essais *in vitro* [0,5-1 mg / ml]. Cette méthode suit les principes reconnus pour améliorer le repliement natif spontané *in vitro*. Ceux-ci sont : maintenir une basse concentration de la protéine à replier afin d'éviter la formation d'agrégats protéiques; maintenir une haute concentration en sels; ajouter jusqu'à 30% (v / v) de glycérol afin d'éviter les interactions hydrophobes non spécifiques; ajouter un tampon de Hepes, Tris ou phosphates afin de stabiliser les états natifs de la protéine; pour la première étape de repliement, maintenir une concentration en urée de 1-2 M, ce qui n'est pas suffisant pour dénaturer les protéines repliées correctement, mais suffisant pour déstabiliser les états intermédiaires (littérature du fabricant Qiagen).

VI. Un modèle d'action de la protéine HFBDQ sur la traduction

L'hypothèse soutenue au sein de notre équipe de recherche est que Staufen serait également impliquée dans le transport et la localisation de l'ARNm chez les mammifères. L'hypothèse que nous proposons pour expliquer la stimulation de la traduction observée dans les RRL par HFBDQ cadre avec un tel modèle.

Dans les fibroblastes, Staufen colocalise avec des marqueurs du ER et cosédimente avec des polysomes, alors que dans des neurones elle colocalise avec le ER, des microtubules et des complexes RNP (pour des revues : DesGroseillers et al.,

1999; Kiebler et DesGroseillers, 2000). De plus, Staufen est détectée dans des immunoprécipités de protéines ribosomales, ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre les ribosomes et Staufen.

Nos résultats démontrent que dans le contexte acellulaire des RRL, sans appareils de transport, l'ajout de HFBDQ stimule la traduction d'un ARN dont la traduction est normalement réprimée par la présence de la structure TAR à son extrémité 5'. Les mécanismes sous-jacents à cette stimulation sont inconnus, mais en se basant sur le mécanisme d'inhibition de la traduction induit par la structure TAR, ainsi que les études de génétiques et de biologie cellulaire sur Staufen chez les mammifères et la drosophile, nous formulons l'hypothèse qui suit. Par sa capacité de former des complexes RNP, son affinité pour la structure secondaire de l'ARN TR et son association avec les ribosomes, Staufen permettrait l'une ou la combinaison des possibilités suivantes : **(1)** une association entre les facteurs de traduction et l'ARNm, ce qui faciliterait alors l'initiation ou la ré-initiation de la traduction; **(2)** une stabilisation de l'ARNm induite par un accès désormais difficile pour les nucléases. Dans la prochaine section nous discutons de ces deux hypothèses ainsi que de leurs implications pour le modèle du transport de l'ARN.

1. La formation de complexes RNP qui rapprocheraient l'ARNm de la machinerie de traduction

A. Dans les RRL

Un ARN normalement traduit, comme l'ARN CAT utilisé dans notre étude, est associé *in vivo* aux polysomes (Choudhury et al, 1999) ce qui est indicatif d'une traduction active du transcrit (Warner et al., 1963). Dans un système comme les RRL, l'ARN CAT est associé aux ribosomes et ceci se manifeste par un taux de traduction

proportionnel à la quantité d'ARN ajoutée. Aussi, l'ajout de HFBDQ, une protéine qui favoriserait une association déficiente entre les facteurs de traduction et l'ARN, n'aurait peu ou pas d'effet avec ce type d'ARNm.

D'un autre côté, l'ARN TARCAT dont la coiffe est difficile d'accès pour les facteurs de la traduction (Parkin et al., 1988), présente une association déficiente avec les polysomes *in vivo* (Choudhury et al., 1999). Aussi, l'ajout de HFBDQ, une protéine qui pourrait favoriser l'association entre les facteurs de traduction et l'ARN stimulerait le taux de traduction en facilitant l'initiation et / ou la ré-initiation de la synthèse peptidique.

B. Dans la cellule

Dans la cellule, l'activité de Staufen peut être régulée par des modifications post-traductionnelles, par la régulation de la stœchiométrie des différentes isoformes de Staufen, par des cofacteurs protéiques ou d'ARN, etc. Notons qu'en appui de cette hypothèse, la surexpression de différentes isoformes de Staufen modifie le patron de distribution intracellulaire du ER et modifie la teneur en ARN associée à des immunoprécipités de Staufen suggérant une fonction différente pour chaque isoformes (Duchaîne et al., soumis pour publication). Un tel phénomène est également retrouvé pour la protéine hnRNP Sqd impliquée dans le transport de l'ARNm *Grk* chez la drosophile [section III.1.B.ii].

Le modèle que nous avançons propose qu'une isoforme de Staufen capable de lier avec forte affinité de l'ARNdb *in vitro* permet la formation de complexes RNP qui contiennent des ribosomes et de l'ARNm. Ces complexes seraient ciblés au ER et / ou s'y formeraient. L'ancrage de ces complexes RNP au ER pourrait permettre de stimuler la traduction des protéines membranaires et / ou destinées à la voie de

sécrétion. D'un autre côté, le ER pourrait servir d'entrepôt de complexes RNP dont la traduction serait réprimée : en réponse à un signal une fraction de ces complexes iraient en périphérie et seraient traduits localement (Kiebler et al., 1999; Köhrmann et al., 1999; pour des revues : DesGroseillers et al., 1999; Kiebler et DesGroseillers, 2000).

2. La formation de complexes RNP qui stabiliseraient l'ARN

Un ARN affublé de la séquence TAR à son extrémité 5' est relativement instable dans les RRL [demi-vie de 20 minutes] (Parkin et al., 1988). Aussi, HFBDQ pourrait stimuler la traduction en protégeant l'ARNm contre la dégradation par des nucléases. Ce type de mécanisme peut être facilement vérifié par la méthode suivante (Svitkin et al., 1994). Le même ARN TARCAT que celui utilisé dans l'étude de ce mémoire est transcrit en présence d'un nucléotide marqué au P^{32} , puis incubé dans un essai de traduction dans des RRL en présence ou non d'une quantité fixe de HFBDQ. Par la suite, des échantillon d'ARN sont extraits de la réaction à des intervalles de temps fixes et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose-formaldéhyde. L'ARN est ensuite observés par l'autoradiographie du gel. Cette méthode devrait permettre d'évaluer la contribution de HFBDQ à la stabilité de l'ARN.

Un tel mécanisme impliquerait alors un rôle de chaperone d'ARN; la régulation de l'association de Staufen à l'ARN serait alors tributaire de la stabilité du transcrit. Cette association / protection pourrait être régulée de façon spatio-temporelle et ainsi ne permettre qu'une expression en des domaines intracellulaires et en des moments spécifiques à la fonction du transcrit.

Conclusion

Notre équipe de recherche étudie le rôle fonctionnel de l'homologue humain de Staufen. Des études génétiques chez la drosophile suggèrent un rôle pour Staufen dans la localisation de certains ARNm ainsi que dans la dépression de la traduction de ceux-ci. Afin de caractériser un éventuel rôle de Staufen dans la traduction chez les mammifères, nous avons conçu une étude *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapins qui évalue l'influence de Staufen sur la traduction d'ARN synthétiques.

Nous avons ainsi pu démontrer qu'un fragment protéique de la protéine Staufen est susceptible de lever la répression de la traduction d'un ARN qui présente la séquence TAR du HIV-1 à son extrémité 5'. Nous avons observé que cette stimulation est proportionnelle à la quantité de protéine recombinante purifiée rajoutée au lysat, qu'elle n'agit pas au niveau de la voie d'inhibition de la kinase PKR et qu'elle n'implique pas une activité hélicase nucléotide dépendante.

A. En perspective

Nous croyons que le modèle proposé reflète une réalité moléculaire et se doit d'être examiné *in vivo* : la stimulation de la traduction observée dans les RRL reflèterait l'affinité de Staufen pour l'ARN et sa capacité de former des complexes RNP. Une des prochaines étapes logiques de la caractérisation moléculaire de Staufen serait de caractériser son rôle *in vivo*. Une façon d'y arriver est de démontrer : (1) Quels sont les ARN associés aux complexes RNP-Staufen endogènes. Est-ce que les complexes RNP-Stau contiennent toutes sortes d'ARN – des ARNm polyadénylés, des ARNr, des ARNt, d'autres ARN non codant – ou bien un seul type? Quels sont les

éléments qui dictent la spécificité d'association *in vivo*? **(2)** Dans les complexes RNP-Stau, quels sont les autres facteurs protéiques présents et quel est leur rôle?

Afin de caractériser ces cofacteurs, des méthodes biochimiques ou génétiques peuvent être envisagées. L'identification des composantes des complexes RNP de Staufen permettra indubitablement d'en connaître plus sur la fonction du gène *Staufen* chez l'humain.

Références

1. Ainger,K., D.Avossa, F.Morgan, S.J.Hill, C.Barry, E.Barbarese, and J.H.Carson. 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 123:431-441.
2. Ainger,K., D.Avossa, A.S.Diana, C.Barry, E.Barbarese, and J.H.Carson. 1997. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J. Cell Biol.* 138 :1077-1087.
3. Alberini,C.M. 1999. Genes to remember. *J. Exp. Biol.* 202:2887-2891.
4. Amon,A. 1996. Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast [comment]. *Cell* 84:651-654.
5. Amur-Umarjee,S., T.Phan, and A.T.Campagnoni. 1993. Myelin basic protein mRNA translocation in oligodendrocytes is inhibited by astrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.* 36:99-110.
6. Arn,E.A. and P.M.Macdonald. 1998. Motors driving mRNA localization: new insights from in vivo imaging. *Cell* 95:151-154.
7. Bachmann,M., K.Pfeifer, H.C.Schroder, and W.E.Muller. 1990. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. *Cell* 60:85-93.
8. Bachmann,M., D.Grolz, H.Bartsch, R.R.Klein, and H.Troster. 1997. Analysis of expression of an alternative La (SS-B) cDNA and localization of the encod. *Biochim. Biophys. Acta* 1356:53-63.
9. Bailey,C.H., D.Bartsch, and E.R.Kandel. 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:13445-13452.
10. Balhorn,R., S.Weston, C.Thomas, and A.J.Wyrobek. 1984. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell Res.* 150:298-308.
11. Barbarese,E., D.E.Koppel, M.P.Deutscher, C.L.Smith, K.Ainger, F.Morgan, and J.H.Carson. 1995. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 8):2781-2790.

12. Bartlett,W.P. and G.A.Banker. 1984. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.* 4:1954-1965.
13. Bashirullah,A., R.L.Cooperstock, and H.D.Lipshitz. 1998. RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* 67:335-94:335-394.
14. Bass,B.L., S.R.Hurst, and J.D.Singer. 1994. Binding properties of newly identified *Xenopus* proteins containing dsRNA-binding motifs. *Curr. Biol.* 4:301-314.
15. Bassell,G. and R.H.Singer. 1997. mRNA and cytoskeletal filaments . *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:109-115.
16. Bassell,G.J., Y.Oleynikov, and R.H.Singer. 1999. The travels of mRNAs through all cells large and small [see comments]. *FASEB J.* 13:447-454.
17. Beach,D.L., E.D.Salmon, and K.Bloom. 1999. Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Curr. Biol.* 9:569-578.
18. Benkirane,M., C.Neuveut, R.F.Chun, S.M.Smith, C.E.Samuel, A.Gatignol, and K.T.Jeang. 1997. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J.* 16:611-624.
19. Bennett,M.K., N.E.Erondu, and M.B.Kennedy. 1983. Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J. Biol. Chem.* 258:12735-12744.
20. Benson,D.L., C.M.Gall, and P.J.Isackson. 1992. Dendritic localization of type II calcium calmodulin-dependent protein kinase mRNA in normal and reinnervated rat hippocampus. *Neuroscience* 46:851-857.
21. Berleth,T., M.Burri, G.Thoma, D.Bopp, S.Richstein, G.Frigerio, M.Noll, and C.Nusslein-Volhard. 1988. The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 7:1749-1756.
22. Bertrand,E., P.Chartrand, M.Schaefer, S.M.Shenoy, R.H.Singer, and R.M.Long. 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* 2:437-445.
23. Bevilacqua,P.C., C.X.George, C.E.Samuel, and T.R.Cech. 1998. Binding of the protein kinase PKR to RNAs with secondary structure defects: role of the tandem A-G mismatch and noncontiguous helices. *Biochemistry* 37:6303-6316.

24. Bian,F., T.Chu, K.Schilling, and J.Oberdick. 1996. Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol. Cell Neurosci.* 7:116-133.
25. Black,R.J., R.M.Friedman, J.Imai, and P.F.Torrence. 1985. Antagonism of 2-5 A-mediated inhibition of protein synthesis in intact cells by 2',5'-(pA)3. *FEBS Lett.* 191:154-158.
26. Bobola,N., R.P.Jansen, T.H.Shin, and K.Nasmyth. 1996. Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells [see comments]. *Cell* 84:699-709.
27. Boswell,R.E. and A.P.Mahowald. 1985. tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 43:97-104.
28. Bovia,F. and K.Strub. 1996. The signal recognition particle and related small cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 11):2601-2608.
29. Braddock,M., A.Chambers, W.Wilson, M.P.Esnouf, S.E.Adams, A.J.Kingsman, and S.M.Kingsman. 1989. HIV-1 TAT "activates" presynthesized RNA in the nucleus. *Cell* 58:269-279.
30. Brand,S.R., R.Kobayashi, and M.B.Mathews. 1997. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* 272:8388-8395.
31. Breitwieser,W., F.H.Markussen, H.Horstmann, and A.Ephrussi. 1996. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10:2179-2188.
32. Broadus,J. and C.Q.Doe. 1997. Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Biol.* 7:827-835.
33. Broadus,J., S.Fuerstenberg, and C.Q.Doe. 1998. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391:792-795.
34. Brophy,P.J., G.L.Boccaccio, and D.R.Colman. 1993. The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *Trends Neurosci.* 16:515-521.
35. Bruckenstein,D.A., P.J.Lein, D.Higgins, and R.T.J.Fremeau. 1990. Distinct spatial localization of specific mRNAs in cultured sympathetic neurons. *Neuron* 5:809-819.

36. Buckanovich, R.J. and R.B. Darnell. 1997. The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 17:3194-3201.
37. Burgin, K.E., M.N. Waxham, S. Rickling, S.A. Westgate, W.C. Mobley, and P.T. Kelly. 1990. In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* 10:1788-1798.
38. Bycroft, M., S. Grunert, A.G. Murzin, M. Proctor, and D. St Johnston. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufer protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5 [published erratum appears in *EMBO J* 1995 Sep 1;14(17):4385]. *EMBO J.* 14:3563-3571.
39. Bycroft, M., M. Proctor, S.M. Freund, and D. St Johnston. 1995. Assignment of the backbone ¹H, ¹⁵N, ¹³C NMR resonances and secondary structure of a double-stranded RNA binding domain from the *Drosophila* protein staufer. *FEBS Lett.* 362:333-336.
40. Cai, R. and B.R. Williams. 1998. Mutations in the double-stranded RNA-activated protein kinase insert region that uncouple catalysis from eIF2 α binding. *J. Biol. Chem.* 273:11274-11280.
41. Campos-Ortega, J.A. 1995. Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Neurobiol.* 10:75-89.
42. Campos-Ortega, J.A. 1997. Asymmetric division: dynastic intricacies of neuroblast division. *Curr. Biol.* 7:R726-R728.
43. Cardin, J.A. and T. Abel. 1999. Memory suppressor genes: Enhancing the relationship between synaptic plasticity and memory storage. *J. Neurosci. Res.* 58:10-23.
44. Carpick, B.W., V. Graziano, D. Schneider, R.K. Maitra, X. Lee, and B.G. Williams. 1997. Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *J. Biol. Chem.* 272:9510-9516.
45. Carson, J.H., S. Kwon, and E. Barbarese. 1998. RNA trafficking in myelinating cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:607-612.
46. Casadio, A., K.C. Martin, M. Giustetto, H. Zhu, M. Chen, D. Bartsch, C.H. Bailey, and E.R. Kandel. 1999. A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis [In Process Citation]. *Cell* 99:221-237.
47. Chan, C.C., J.J. Hooks, R.B. Nussenblatt, and B. Detrick. 1986. Expression of Ia antigen on retinal pigment epithelium in experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr. Eye Res.* 5:325-330.

48. Chan,E.K., K.F.Sullivan, R.I.Fox, and E.M.Tan. 1989. Sjogren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. *J. Autoimmun.* 2:321-327.
49. Chang,J.S., L.Tan, and P.Schedl. 1999. The drosophila CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes [In Process Citation]. *Dev. Biol.* 215:91-106.
50. Chang,K.Y. and I.J.Tinoco. 1997. The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement. *J. Mol. Biol.* 269:52-66.
51. Chang,Y.N., D.J.Kenan, J.D.Keene, A.Gatignol, and K.T.Jeang. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA [published erratum appears in J Virol 1995 Jan;69(1):618]. *J. Virol.* 68:7008-7020.
52. Chao,Y.C., K.M.Donahue, N.J.Pokrywka, and E.C.Stephenson. 1991. Sequence of swallow, a gene required for the localization of bicoid message in *Drosophila* eggs. *Dev. Genet.* 12:333-341.
53. Chartrand,P., X.H.Meng, R.H.Singer, and R.M.Long. 1999. Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr. Biol.* 9:333-336.
54. Cheng,J.G., H.Tiedge, and J.Brosius. 1996. Identification and characterization of BC1 RNP particles. *DNA Cell Biol.* 15:549-559.
55. Chicurel,M.E. and K.M.Harris. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325:169-182.
56. Chicurel,M.E., D.M.Terrian, and H.Potter. 1993. mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines. *J. Neurosci.* 13:4054-4063.
57. Chong,K.L., L.Feng, K.Schappert, E.Meurs , T.F.Donahue, J.D.Friesen, A.G.Hovanessian, and B.R.Williams. 1992. Human p68 kinase exhibits growth suppression in yeast and homology to the translational regulator GCN2. *EMBO J.* 11:1553-1562.
58. Choudhury,I., J.Wang, S.Stein, A.Rabson, and M.J.Leibowitz. 1999. Translational effects of peptide antagonists of Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 3):777-782.
59. Chu-Lagraff,Q., D.M.Wright, L.K.McNeil, and C.Q.Doe. 1991. The prospero gene encodes a divergent homeodomain protein that controls neuronal identity in *Drosophila*. *Development Suppl* 2:79-85:79-85.

60. Chu,W.M., R.Ballard, B.W.Carpick, B.R.Williams, and C.W.Schmid. 1998. Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol. Cell Biol.* 18:58-68.
61. Clark,I., E.Giniger, H.Ruohola-Baker, L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1994. Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* 4:289-300.
62. Clarke,P.A. and M.B.Mathews. 1995. Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA. *RNA.* 1:7-20.
63. Clemens,M.J., B.Safer, W.C.Merrick, W.F.Anderson, and I.M.London. 1975. Inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates by double-stranded RNA and oxidized glutathione: indirect mode of action on polypeptide chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:1286-1290.
64. Clemens,M.J. and U.A.Bommer. 1999. Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:1-23.
65. Colman,D.R., G.Kreibich, A.B.Frey, and D.D.Sabatini. 1982. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.* 95:598-608.
66. Colvin,R.A. and M.A.Garcia-Blanco. 1992. Unusual structure of the human immunodeficiency virus type 1 trans- activation response element. *J. Virol.* 66:930-935.
67. Cosentino,G.P., S.Venkatesan, F.C.Serluca, S.R.Green, M.B.Mathews, and N.Sonenberg. 1995. Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9445-9449.
68. Cosentino,G.P., S.Venkatesan, F.C.Serluca, S.R.Green, M.B.Mathews, and N.Sonenberg. 1995. Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:9445-9449.
69. Costa,C., D.P.Romancino, A.Ingrassia, A.Vizzini, and M.Di Carlo. 1999. Isolation of a trans-acting factor involved in localization of *Paracentrotus lividus* maternal mRNAs. *RNA.* 5:1290-1298.
70. Cote,C.A., D.Gautreau, J.M.Denegre, T.L.Kress, N.A.Terry, and K.L.Mowry. 1999. A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol. Cell* 4:431-437.

71. Craig,A.M., C.D.Blackstone, R.L.Huganir, and G.Banker. 1993. The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10:1055-1068.
72. Craig,A.M. and G.Banker. 1994. Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:267-310:267-310.
73. Craig,A.W., Y.V.Svitkin, H.S.Lee, G.J.Belsham, and N.Sonenberg. 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. *Mol. Cell Biol.* 17:163-169.
74. Cuddihy,A.R., A.H.Wong, N.W.Tam, S.Li, and A.E.Koromilas. 1999. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro [In Process Citation]. *Oncogene* 18:2690-2702.
75. Cuddihy,A.R., S.Li, N.W.Tam, A.H.Wong, Y.Taya, N.Abraham, J.C.Bell, and A.E.Koromilas. 1999. Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol. Cell Biol.* 19:2475-2484.
76. Cullen,B.R. 1986. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 46:973-982.
77. Curtis,D., R.Lehmann, and P.D.Zamore. 1995. Translational regulation in development. *Cell* 81:171-178.
78. de Haro,C., R.Mendez, and J.Santoyo. 1996. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 10:1378-1387.
79. Dejgaard,K. and H.Leffers. 1996. Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur. J. Biochem.* 241:425-431.
80. Denu,J.M., D.L.Lohse, J.Vijayalakshmi, M.A.Saper, and J.E.Dixon. 1996. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2493-2498.
81. Der,S.D. and A.S.Lau. 1995. Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:8841-8845.

82. Der, S.D., Y.L. Yang, C. Weissmann, and B.R. Williams. 1997. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3279-3283.
83. DesGroseillers, L. and N. Lemieux. 1996. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36:527-529.
84. DesGroseillers, L., T. Duchaine, and M. Luo. 1999. Role of stau1 in mRNA transport and localization in mammals [French]. *M S-Med.* 15:1164-1167.
85. Dever, T.E., R. Sripriya, J.R. McLachlin, J. Lu, J.R. Fabian, S.R. Kimball, and L.K. Miller. 1998. Disruption of cellular translational control by a viral truncated eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:4164-4169.
86. Doe, C.Q., Q. Chu-Lagraff, D.M. Wright, and M.P. Scott. 1991. The prospero gene specifies cell fates in the Drosophila central nervous system. *Cell* 65:451-464.
87. Doe, C.Q. and G.M. Technau. 1993. Identification and cell lineage of individual neural precursors in the Drosophila CNS. *Trends. Neurosci.* 16:510-514.
88. Doe, C.Q. 1996. Spindle orientation and asymmetric localization in Drosophila: both inscuteable? [published erratum appears in *Cell* 1996 Oct 18;87(2):following 355]. *Cell* 86:695-697.
89. Dreyfuss, G., Y.D. Choi, and S.A. Adam. 1989. The ribonucleoprotein structures along the pathway of mRNA formation. *Endocr. Res.* 15:441-474.
90. Dreyfuss, G., M.J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C.G. Burd. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62:289-321.
91. Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1988. A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos. *Cell* 54:83-93.
92. Driever, W. and C. Nusslein-Volhard. 1988. The bicoid protein determines position in the Drosophila embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54:95-104.
93. Driever, W., V. Siegel, and C. Nusslein-Volhard. 1990. Autonomous determination of anterior structures in the early Drosophila embryo by the bicoid morphogen. *Development* 109:811-820.

94. Dudek,S.M. and M.F.Bear. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:4363-4367.
95. Dugich-Djordjevic,M.M., G.Tocco, D.A.Willoughby, I.Najm, G.Pasinetti, R.F.Thompson, M.Baudry, P.A.Lapchak, and F.Hefli. 1992. BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid- induced seizure activity. *Neuron* 8:1127-1138.
96. Eckmann,C.R. and M.F.Jantsch. 1997. Xlrpba, a double-stranded RNA-binding protein associated with ribosomes and heterogeneous nuclear RNPs. *J. Cell Biol.* 138:239-253.
97. Edery,I., R.Petryshyn, and N.Sonenberg. 1989. Activation of double-stranded RNA-dependent kinase (dsl) by the TAR region of HIV-1 mRNA: a novel translational control mechanism. *Cell* 56:303-312.
98. Eilers,J. and A.Konnerth. 1997. Dendritic signal integration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:385-390.
99. Elledge,S.J. and J.W.Harper. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:847-852.
100. Ephrussi,A., L.K.Dickinson, and R.Lehmann. 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66:37-50.
101. Ephrussi,A. and R.Lehmann. 1992. Induction of germ cell formation by oskar [see comments]. *Nature* 358:387-392.
102. Erard,M., D.G.Barker, F.Amalric, K.T.Jeang, and A.Gatignol. 1998. An Arg/Lys-rich core peptide mimics TRBP binding to the HIV-1 TAR RNA upper-stem/loop. *J. Mol. Biol.* 279:1085-1099.
103. Erdelyi,M., A.M.Michon, A.Guichet, J.B.Glotzer, and A.Ephrussi. 1995. Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization [see comments]. *Nature* 377:524-527.
104. Erondy,N.E. and M.B.Kennedy. 1985. Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.* 5:3270-3277.
105. Etkin,L.D. and H.D.Lipshitz. 1999. RNA localization [comment]. *FASEB J.* 13:419-420.

106. Falc, P.Fortes, Mari, A.Beloso, and Ort. 1999. Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic. Acids. Res.* 27:2241-2247.
107. Fanarraga,M.L., I.U.Sommer, I.R.Griffiths, P.Montague, N.P.Groome, K.A.Nave, A.Schneider, P.J.Brophy, and P.G.Kennedy. 1993. Oligodendrocyte development and differentiation in the rumpshaker mutation. *Glia* 9:146-156.
108. FASEB journal. FASEB J. 13. 1999.
109. Faux,M.C. and J.D.Scott. 1996. More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21:312-315.
110. Feig,S. and P.Lipton. 1993. Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 13:1010-1021.
111. Feng,G.S., K.Chong, A.Kumar, and B.R.Williams. 1992. Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon- induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:5447-5451.
112. Ferrandon,D., L.Elphick, C.Nusslein-Volhard, and D.St Johnston. 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
113. Ferrandon,D., I.Koch, E.Westhof, and C.Nusslein-Volhard. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16:1751-1758.
114. Fields,S. 1990. Pheromone response in yeast. *Trends. Biochem. Sci.* 15:270-273.
115. Francoeur,A.M., C.L.Peebles, K.J.Heckman, J.C.Lee, and E.M.Tan. 1985. Identification of ribosomal protein autoantigens. *J. Immunol.* 135:2378-2384.
116. Frigerio,G., M.Burri, D.Bopp, S.Baumgartner, and M.Noll. 1986. Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. *Cell* 47:735-746.
117. Frugier,M. and P.Schimmel. 1997. Subtle atomic group discrimination in the RNA minor groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:11291-11294.

118. Frugier,M. and P.Schimmel. 1997. Subtle atomic group discrimination in the RNA minor groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:11291-11294.
119. Fuerstenberg,S., C.Y.Peng, P.Alvarez-Ortiz, T.Hor, and C.Q.Doe. 1998. Identification of Miranda protein domains regulating asymmetric cortical localization, cargo binding, and cortical release. *Mol. Cell Neurosci.* 12:325-339.
120. Fuerstenberg,S., J.Broadus, and C.Q.Doe. 1998. Asymmetry and cell fate in the Drosophila embryonic CNS. *Int. J. Dev. Biol.* 42:379-383.
121. Furuichi,T., D.Simon-Chazottes, I.Fujino, N.Yamada, M.Hasegawa, A.Miyawaki, S.Yoshikawa, J.L.Guenet, and K.Mikoshiba. 1993. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. *Receptors. Channels* 1:11-24.
122. Galabru,J. and A.G.Hovanessian. 1985. Two interferon-induced proteins are involved in the protein kinase complex dependent on double-stranded RNA. *Cell* 43:685-694.
123. Galabru,J., B.Krust, A.G.Laurent, and A.G.Hovanessian. 1985. Characterization of the double-stranded RNA dependent protein kinase complex. *Prog. Clin. Biol. Res.* 202:255-266.
124. Gallo,R.C., P.S.Sarin, E.P.Gelmann, M.Robert-Guroff, E.Richardson, V.S.Kalyanaraman, D.Mann, G.D.Sidhu, R.E.Stahl, S.Zolla-Pazner, J.Leibowitch, and M.Popovic. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-867.
125. Garcia,J.A., F.K.Wu, R.Mitsuyasu, and R.B.Gaynor. 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* 6:3761-3770.
126. Garcia,V.E., D.Jullien, M.Song, K.Uyemura, K.Shuai, C.T.Morita, and R.L.Modlin. 1998. IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens. *J. Immunol.* 160:4322-4329.
127. Garner,C.C., R.P.Tucker, and A.Matus. 1988. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336:674-677.
128. Gatignol,A., A.Buckler-White, B.Berkhout, and K.T.Jeang. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* 251:1597-1600.

129. Gagnol,A., C.Buckler, and K.T.Jeang. 1993. Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsI kinase and *Drosophila* staufen. *Mol. Cell Biol.* 13:2193-2202.
130. Gavis,E.R. and R.Lehmann. 1992. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71:301-313.
131. Gavis,E.R. and R.Lehmann. 1994. Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature* 369:315-318.
132. Geballe,A.P. and M.K.Gray. 1992. Variable inhibition of cell-free translation by HIV-1 transcript leader sequences. *Nucleic Acids Res.* 20:4291-4297.
133. Gebauer,F. and J.D.Richter. 1996. Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: an evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of c-mos mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14602-14607.
134. Gelmann,E.P., M.Popovic, D.Blayney, H.Masur, G.Sidhu, R.E.Stahl, and R.C.Gallo. 1983. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. *Science* 220:862-865.
135. Gibson,T.J. and J.D.Thompson. 1994. Detection of dsRNA-binding domains in RNA helicase A and *Drosophila* maleless: implications for monomeric RNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 22:2552-2556.
136. Gil,J., J.Alcami, and M.Esteban. 1999. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 19:4653-4663.
137. Gonzalez,I., S.B.Buonomo, K.Nasmyth, and U.von Ahsen. 1999. ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr. Biol.* 9:337-340.
138. Goodier,J.L., H.Fan, and R.J.Maraia. 1997. A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Mol. Cell Biol.* 17:5823-5832.
139. Gottlieb,E. 1992. The 3' untranslated region of localized maternal messages contains a conserved motif involved in mRNA localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:7164-7168.
140. Green,S.R. and M.B.Mathews. 1992. Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI. *Genes Dev.* 6:2478-2490.

141. Gunkel,N., T.Yano, F.H.Markussen, L.C.Olsen, and A.Ephrussi. 1998. Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* 12:1652-1664.
142. Gunnery,S. and M.B.Mathews. 1998. RNA binding and modulation of PKR activity. *Methods* 15:189-198.
143. Hamy,F., U.Asseline, J.Grasby, S.Iwai, C.Pritchard, G.Slim, P.J.Butler, J.Karn, and M.J.Gait. 1993. Hydrogen-bonding contacts in the major groove are required for human immunodeficiency virus type-1 tat protein recognition of TAR RNA. *J. Mol. Biol.* 230:111-123.
144. Han,J.R., G.K.Yiu, and N.B.Hecht. 1995. Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9550-9554.
145. Han,J.R., W.Gu, and N.B.Hecht. 1995. Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. *Biol. Reprod.* 53:707-717.
146. Harding,H.P., Y.Zhang, and D.Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum- resident kinase [published erratum appears in Nature 1999 Mar 4;398(6722):90] [see comments]. *Nature* 397:271-274.
147. Hatada,E., S.Saito, and R.Fukuda. 1999. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J. Virol.* 73:2425-2433.
148. Hauber,J. and B.R.Cullen. 1988. Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* 62:673-679.
149. Hazelrigg,T. 1998. The destinies and destinations of RNAs. *Cell* 95:451-460.
150. Hegde,J. and E.C.Stephenson. 1993. Distribution of swallow protein in egg chambers and embryos of *Drosophila melanogaster*. *Development* 119:457-470.
151. Heldin,C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.
152. Hentze,M.W. 1995. Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:393-398.

153. Herb,A., W.Wisden, M.V.Catania, D.Marechal, A.Dresse, and P.H.Seeburg . 1997. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol. Cell Neurosci.* 8:367-374.
154. Herskowitz,I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52:536-553.
155. Hill,M.A. and P.Gunning. 1993. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J. Cell Biol.* 122:825-832.
156. Hill,M.A., L.Schedlich, and P.Gunning. 1994. Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell. *J. Cell Biol.* 126:1221-1229.
157. Hitti,E., A.Neunteufl, and M.F.Jantsch. 1998. The double-stranded RNA-binding protein X1rbpa promotes RNA strand annealing. *Nucleic Acids Res.* 26:4382-4388.
158. Hoek,K.S., G.J.Kidd, J.H.Carson, and R.Smith. 1998. hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37:7021-7029.
159. Hofer,H.W. 1996. Conservation, evolution, and specificity in cellular control by protein phosphorylation. *Experientia* 52:449-454.
160. Holmes,E., G.Hermanson, R.Cole, and J.de Vellis. 1988. Developmental expression of glial-specific mRNAs in primary cultures of rat brain visualized by in situ hybridization. *J. Neurosci. Res.* 19:389-65.
161. Hooek,T.C., P.M.Newcomb, and I.M.Herman. 1991. Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J. Cell Biol.* 112:653-664.
162. Hovanessian,A.G. and I.M.Kerr. 1978. Synthesis of an oligonucleotide inhibitor of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates analogous to that formed in extracts from interferon-treated cells. *Eur. J. Biochem.* 84:149-159.
163. Hovanessian,A.G., J.Wood, E.Meurs, and L.Montagnier. 1979. Increased nuclease activity in cells treated with pppA2'p5'A2'p5' A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:3261-3265.
164. Hu,Y. and T.W.Conway. 1993. 2-Aminopurine inhibits the double-stranded RNA-dependent protein kinase both in vitro and in vivo. *J. Interferon. Res.* 13:323-328.

165. Huang,E.P. 1999. Synaptic plasticity: regulated translation in dendrites. *Curr. Biol.* 9:R168-R170.
166. Huang,L.M., A.Joshi, R.Willey, J.Orenstein, and K.T.Jeang. 1994. Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans- activators: genetic evidence for a novel non-transcriptional function of Tat in virion infectivity. *EMBO J.* 13:2886-2896.
167. Huang,Y.Y., P.V.Nguyen, T.Abel, and E.R.Kandel. 1996. Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn. Mem.* 3:74-85.
168. Hubbard,M.J. and P.Cohen. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 18:172-177.
169. Huhn,P., G.J.Pruijn, W.J.van Venrooij, and M.Bachmann. 1997. Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. *Nucleic Acids Res.* 25:410-416.
170. Hunter,T., T.Hunt, R.J.Jackson, and H.D.Robertson. 1975. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double- stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250:409-417.
171. Hurst,S., N.J.Talbot, and H.Stebbins. 1999. A staufen-like RNA-binding protein in translocation channels linking nurse cells to oocytes in notonecta shows nucleotide-dependent attachment to microtubules [In Process Citation]. *J. Cell Sci.* 112:2947-2955.
172. Iida,T. and S.Kobayashi. 1998. Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germline formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:11274-11278.
173. Ikeshima-Kataoka,H., J.B.Skeath, Y.Nabeshima, C.Q.Doe, and F.Matsuzaki. 1997. Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390:625-629.
174. Ito,T., M.Yang, and W.S.May. 1999. RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling [In Process Citation]. *J. Biol. Chem.* 274:15427-15432.
175. Jagus,R., B.Joshi, and G.N.Barber. 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:123-138.
176. Jan,Y.N. and L.Y.Jan. 1998. Asymmetric cell division. *Nature* 392:775-778.

177. Jansen,R.P., C.Dowzer, C.Michaelis, M.Galova, and K.Nasmyth. 1996. Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins [see comments]. *Cell* 84:687-697.
178. Jeffrey,I.W., S.Kadereit, E.F.Meurs, T.Metzger, M.Bachmann, M.Schwemmler, A.G.Hovanessian, and M.J.Clemens. 1995. Nuclear localization of the interferon-inducible protein kinase PKR in human cells and transfected mouse cells. *Exp. Cell Res.* 218:17-27.
179. Jimenez-Garcia,L.F., S.R.Green, M.B.Mathews, and D.L.Spector. 1993. Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNAI in adenovirus-2-infected HeLa cells. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 1):11-22.
180. Johnson,L.N. and M.O'Reilly. 1996. Control by phosphorylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:762-769.
181. Jones,K.A., P.A.Luciw, and N.Duchange. 1988. Structural arrangements of transcription control domains within the 5'- untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev.* 2:1101-1114.
182. Jones,K.A. and B.M.Peterlin. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63:717-743.
183. Jones,K.A. 1997. Taking a new TAK on tat transactivation [comment]. *Genes Dev.* 11:2593-2599.
184. Kang,H. and E.M.Schuman. 1996. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-1406.
185. Katze,M.G., M.Wambach, M.L.Wong, M.Garfinkel, E.Meurs, K.Chong, B.R.Williams, A.G.Hovanessian, and G.N.Barber. 1991. Functional expression and RNA binding analysis of the interferon- induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system. *Mol. Cell Biol.* 11:5497-5505.
186. Keen,N.J., M.J.Gait, and J.Karn. 1996. Human immunodeficiency virus type-1 Tat is an integral component of the activated transcription-elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2505-2510.
187. Kelley,R.L. 1993. Initial organization of the Drosophila dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the squid gene. *Genes Dev.* 7:948-960.

188. Kemp,B.E. and R.B.Pearson. 1991. Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Methods Enzymol.* 200:121-134.
189. Kennedy,M.B. 1998. Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26:243-257.
190. Kharrat,A., M.J.Macias, T.J.Gibson, M.Nilges, and A.Pastore. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *EMBO J.* 14:3572-3584.
191. Kiebler,M.A., I.Hemraj, P.Verkaide, M.Kohrmann, P.Fortes, R.M.Marion, J.Ortin, and C.G.Dotti. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* 19:288-297.
192. Kiebler,M.A. and L.DesGroseillers. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system neuron. *Neuron* in press. 2000.
Ref Type: Generic
193. Kim-Ha,J., J.L.Smith, and P.M.Macdonald. 1991. oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte. *Cell* 66:23-35.
194. Kim-Ha,J., P.J.Webster, J.L.Smith, and P.M.Macdonald. 1993. Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development* 119:169-178.
195. Kim-Ha,J., K.Kerr, and P.M.Macdonald. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81:403-412.
196. Kim,J.H. and R.L.Huganir. 1999. Organization and regulation of proteins at synapses [published erratum appears in *Curr Opin Cell Biol* 1999 Jun;11(3):407-8]. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:248-254.
197. Kimball,S.R. 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:25-29.
198. King,R.C. 1970. The meiotic behavior of the Drosophila oocyte. *Int. Rev. Cytol.* 28:125-68:125-168.
199. Kislauskis,E.H., X.Zhu, and R.H.Singer. 1997. beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility [published erratum appears in *J Cell Biol* 1997 Jun 30;137(7):1683]. *J. Cell Biol.* 136:1263-1270.

200. Kleiman,R., G.Banker, and O.Steward. 1990. Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron* 5:821-830.
201. Kleiman,R., G.Banker, and O.Steward. 1993. Subcellular distribution of rRNA and poly(A) RNA in hippocampal neurons in culture. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 20:305-312.
202. Kleiman,R., G.Banker, and O.Steward. 1994. Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 14:1130-1140.
203. Knoblich,J.A., L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1999. Deletion analysis of the Drosophila Inscuteable protein reveals domains for cortical localization and asymmetric localization. *Curr. Biol.* 9:155-158.
204. Knowles,R.B., J.H.Sabry, M.E.Martone, T.J.Deerinck, M.H.Ellisman, G.J.Bassell, and K.S.Kosik. 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* 16:7812-7820.
205. Kobayashi,S., A.Takashima, and K.Anzai. 1998. The dendritic translocation of translin protein in the form of BCI RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:448-453.
206. Koh,Y.H., E.Popova, U.Thomas, L.C.Griffith, and V.Budnik. 1999. Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* 98:353-363.
207. Kohrmann,M., W.Haubensak, I.Hemraj, C.Kaether, V.J.Lessmann, and M.A.Kiebler. 1999. Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons [In Process Citation]. *J. Neurosci. Res.* 58:831-835.
208. Kozak,C.A., A.Gatignol, K.Graham, K.T.Jeang, and O.W.McBride. 1995. Genetic mapping in human and mouse of the locus encoding TRBP, a protein that binds the TAR region of the human immunodeficiency virus (HIV-1). *Genomics* 25:66-72.
209. Kraut,R., W.Chia, L.Y.Jan, Y.N.Jan, and J.A.Knoblich. 1996. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in Drosophila. *Nature* 383:50-55.
210. Kraut,R. and J.A.Campos-Ortega. 1996. inscuteable, a neural precursor gene of Drosophila, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev. Biol.* 174:65-81.
211. Krecic,A.M. and M.S.Swanson. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:363-371.

212. Kremerskothen,J., M.Nettermann, d.B.op, M.Bachmann, and J.Brosius. 1998. Identification of human autoantigen La/SS-B as BC1/BC200 RNA-binding protein. *DNA Cell Biol.* 17:751-759.
213. Kremerskothen,J., D.Zopf, P.Walter, J.G.Cheng, M.Nettermann, U.Niewerth, R.J.Maraia, and J.Brosius . 1998. Heterodimer SRP9/14 is an integral part of the neural BC200 RNP in primate brain. *Neurosci. Lett.* 245:123-126.
214. Krovat,B.C. and M.F.Jantsch. 1996. Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *J. Biol. Chem.* 271:28112-28119.
215. Kuhl,D. and P.Skehel. 1998. Dendritic localization of mRNAs [published erratum appears in *Curr Opin Neurobiol* 1999 Feb;9(1):142]. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:600-606.
216. Kuhn,H., D.Heydeck, R.Brinckman, and F.Trebus. 1999. Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. *Lipids* 34 Suppl:S273-S279.
217. Kumar,A., J.Haque, J.Lacoste, J.Hiscott , and B.R.Williams. 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:6288-6292.
218. Kumar,K.U., S.P.Srivastava, and R.J.Kaufman. 1999. Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol. Cell Biol.* 19:1116-1125.
219. Kwon,S., E.Barbarese, and J.H.Carson. 1999. The cis-acting RNA trafficking signal from myelin basic protein mRNA and its cognate trans-acting ligand hnRNP A2 enhance cap-dependent translation. *J. Cell Biol.* 147:247-256.
220. Kwon,Y.K. and N.B.Hecht. 1991. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:3584-3588.
221. Kwon,Y.K. and N.B.Hecht. 1993. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol. Cell Biol.* 13:6547-6557.
222. Ladomery,M. 1997. Multifunctional proteins suggest connections between transcriptional and post-transcriptional processes. *Bioessays* 19:903-909.

223. Lall,S., H.Francis-Lang, A.Flament, A.Norvell, T.Schupbach, and D.Ish-Horowicz. 1999. Squid hnRNP protein promotes apical cytoplasmic transport and localization of Drosophila pair-rule transcripts. *Cell* 98:171-180.
224. Landry,C.F., J.B.Watson, T.Kashima, and A.T.Campagnoni. 1994. Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27:1-11.
225. Lane,M.E. and D.Kalderon. 1994. RNA localization along the anteroposterior axis of the Drosophila oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev.* 8:2986-2995.
226. Langland,J.O., P.N.Kao, and B.L.Jacobs. 1999. Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 38:6361-6368.
227. Lasko,P. 1999. RNA sorting in Drosophila oocytes and embryos [see comments]. *FASEB J.* 13:421-433.
228. Latham,V.M., Jr., E.H.Kislauskis, R.H.Singer, and A.F.Ross. 1994. Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J. Cell Biol.* 126:1211-1219.
229. Lawrence,J.B. and R.H.Singer. 1986. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* 45:407-415.
230. Lee,M.H., S.Mori, and P.Raychaudhuri. 1996. trans-Activation by the hnRNP K protein involves an increase in RNA synthesis from the reporter genes. *J. Biol. Chem.* 271:3420-3427.
231. Lee,S.B. and M.Esteban. 1993. The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology* 193:1037-1041.
232. Lee,S.B., Z.Melkova, W.Yan, B.R.Williams, A.G.Hovanessian, and M.Esteban. 1993. The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology* 192:380-385.
233. Lee,S.B. and M.Esteban. 1994. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199:491-496.
234. Lee,S.B., S.R.Green, M.B.Mathews, and M.Esteban. 1994. Activation of the double-stranded RNA (dsRNA)-activated human protein kinase in vivo in the absence of its dsRNA binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:10551-10555.

235. Lehmann,R. and C.Nusslein-Volhard. 1986. Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* 47:141-152.
236. Lehmann,R. and C.Nusslein-Volhard. 1991. The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* 112:679-691.
237. Li,M., M.McGrail, M.Serr, and T.S.Hays. 1994. *Drosophila* cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte. *J. Cell Biol.* 126:1475-1494.
238. Li,P., X.Yang, M.Wasser, Y.Cai, and W.Chia. 1997. Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90:437-447.
239. Lie,Y.S. and P.M.Macdonald. 1999. Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* 126:1129-1138.
240. Lie,Y.S. and P.M.Macdonald. 1999. Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in *drosophila* ovarian extracts [In Process Citation]. *Development* 126:4989-4996.
241. Linden,D.J. 1994. Input-specific induction of cerebellar long-term depression does not require presynaptic alteration. *Learn. Mem.* 1:121-128.
242. Link,W., U.Konietzko, G.Kauselmann, M.Krug, B.Schwanke, U.Frey, and D.Kuhl. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:5734-5738.
243. Liu,Z.R., A.M.Wilkie, M.J.Clemens, and C.W.Smith. 1996. Detection of double-stranded RNA-protein interactions by methylene blue- mediated photo-crosslinking. *RNA.* 2:611-621.
244. Lledo,P.M., G.O.Hjelmstad, S.Mukherji, T.R.Soderling, R.C.Malenka, and R.A.Nicoll. 1995. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:11175-11179.
245. Long,R.M., R.H.Singer, X.Meng, I.Gonzalez, K.Nasmyth, and R.P.Jansen . 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277:383-387.
246. Lu,Y., M.Wambach, M.G.Katze, and R.M.Krug. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214:222-228.

247. Lyford,G.L., K.Yamagata, W.E.Kaufmann, C.A.Barnes, L.K.Sanders, N.G.Copeland, D.J.Gilbert, N.A.Jenkins, A.A.Lanahan, and P.F.Worley. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
248. Macdonald,P.M. and G.Struhl. 1988. cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in Drosophila embryos. *Nature* 336:595-598.
249. Macdonald,P.M. 1990. bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110:161-171.
250. Macdonald,P.M., K.Kerr, J.L.Smith, and A.Leask. 1993. RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* 118:1233-1243.
251. Macdonald,P.M., A.Leask, and K.Kerr. 1995. exl protein specifically binds BLE1, a bicoid mRNA localization element, and is required for one phase of its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:10787-10791.
252. Macdonald,P.M. and K.Kerr. 1997. Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization. *RNA*. 3:1413-1420.
253. Macdonald,P.M. and K.Kerr. 1998. Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol. Cell Biol.* 18:3788-3795.
254. Maitra,R.K., N.A.McMillan, S.Desai, J.McSwiggen, A.G.Hovanessian, G.Sen, B.R.Williams, and R.H.Silverman. 1994. HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* 204:823-827.
255. Malenka,R.C. 1994. Synaptic plasticity. Mucking up movements [news; comment]. *Nature* 372:218-219.
256. Manche,L., S.R.Green, C.Schmedt, and M.B.Mathews. 1992. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell Biol.* 12:5238-5248.
257. Manseau,L., J.Calley, and H.Phan. 1996. Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. *Development* 122:2109-2116.
258. Maraia,R.J. 1996. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:3383-3387.

259. Marcey,D., W.S.Watkins, and T.Hazelrigg. 1991. The temporal and spatial distribution pattern of maternal exuperantia protein: evidence for a role in establishment but not maintenance of bicoid mRNA localization. *EMBO J.* 10:4259-4266.
260. Marcus,P.I. and M.J.Sekellick. 1988. Interferon induction by viruses. XVI. 2-Aminopurine blocks selectively and reversibly an early stage in interferon induction. *J. Gen. Virol.* 69:1637-1645.
261. Marion,R.M., P.Fortes, A.Beloso, C.Dotti, and J.Ortin. 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* 19:2212-2219.
262. Markussen,F.H., A.M.Michon, W.Breitwieser, and A.Ephrussi. 1995. Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* 121:3723-3732.
263. Markussen,F.H., W.Breitwieser, and A.Ephrussi. 1997. Efficient translation and phosphorylation of Oskar require Oskar protein and the RNA helicase Vasa. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62:13-7:13-17.
264. Martin,K.C., A.Casadio, H.Zhu, J.C.Rose , M.Chen, C.H.Bailey, and E.R.Kandel. 1997. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91:927-938.
265. Matsuzaki,F., T.Ohshiro, H.Ikeshima-Kataoka, and H.Izumi. 1998. miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis. *Development* 125:4089-4098.
266. Mavankal,G., S.H.Ignatius Ou, H.Oliver, D.Sigman, and R.B.Gaynor. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 and 2 Tat proteins specifically interact with RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2089-2094.
267. Mayford,M., D.Baranes, K.Podsypanina, and E.R.Kandel. 1996. The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:13250-13255.
268. Mayford,M., M.E.Bach, and E.Kandel. 1996. CaMKII function in the nervous system explored from a genetic perspective. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61:219-224.
269. McCarthy,J.E. and H.Kollmus. 1995. Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 20:191-197.

270. McCormack,S.J., D.C.Thomis, and C.E.Samuel. 1992. Mechanism of interferon action: identification of a RNA binding domain within the N-terminal region of the human RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase. *Virology* 188:47-56.
271. McCormack,S.J. and C.E.Samuel. 1995. Mechanism of interferon action: RNA-binding activity of full-length and R-domain forms of the RNA-dependent protein kinase PKR--determination of KD values for VAI and TAR RNAs. *Virology* 206:511-519.
272. McKinnon,R.D., P.Danielson, M.A.Brow, F.E.Bloom, and J.G.Sutcliffe. 1987. Expression of small cytoplasmic transcripts of the rat identifier element in vivo and in cultured cells. *Mol. Cell Biol.* 7:2148-2154.
273. Meerovitch,K., Y.V.Svitkin, H.S.Lee, F.Lejbkowitz, D.J.Kenan, E.K.Chan, V.I.Agol, J.D.Keene, and N.Sonenberg. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* 67:3798-3807.
274. Melton,D.A. 1987. Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature* 328:80-82.
275. Meurs,E., K.Chong, J.Galabru, N.S.Thomas, I.M.Kerr, B.R.Williams, and A.G.Hovanessian. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA- activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62:379-390.
276. Meurs,E.F., J.Galabru, G.N.Barber, M.G.Katze, and A.G.Hovanessian. 1993. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA- activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:232-236.
277. Meurs,E.F., N.McMillan, B.R.Williams, A.G.Hovanessian, and P.J.Southern. 1995. Human PKR transfected into murine cells stimulates expression of genes under control of the HIV1 or HTLV-I LTR [published erratum appears in *Virology* 1998 Jul 20;247(1):125]. *Virology* 214:653-659.
278. Miyashiro,K., M.Dichter, and J.Eberwine. 1994. On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:10800-10804.
279. Mohr,E., U.Bahnsen, C.Kiessling, and D.Richter. 1988. Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett.* 242:144-148.
280. Mohr,E., S.Fehr, and D.Richter. 1991. Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo- hypophyseal tract of rats. *EMBO J.* 10:2419-2424.

281. Mohr,E. and D.Richter. 1993. Dendritic and axonal mRNA trafficking. *Regul. Pept.* 45:21-24.
282. Mohr,E. and D.Richter. 1993. Hypothalamic neuropeptide genes. Aspects of evolution, expression, and subcellular mRNA distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 689:50-58.
283. Mohr,E., J.F.Morris, and D.Richter. 1995. Differential subcellular mRNA targeting: deletion of a single nucleotide prevents the transport to axons but not to dendrites of rat hypothalamic magnocellular neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:4377-4381.
284. Mohr,E. 1999. Subcellular RNA compartmentalization. *Prog. Neurobiol.* 57:507-525.
285. Morales,C.R., X.Q.Wu, and N.B.Hecht. 1998. The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. *Dev. Biol.* 201:113-123.
286. Mowry,K.L. and C.A.Cote. 1999. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos [see comments]. *FASEB J.* 13:435-445.
287. Muesing,M.A., D.H.Smith, C.D.Cabradilla, C.V.Benton, L.A.Lasky, and D.J.Capon. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450-458.
288. Muesing,M.A., D.H.Smith, and D.J.Capon. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans- activator protein. *Cell* 48:691-701.
289. Munchow,S., C.Sauter, and R.P.Jansen. 1999. Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J. Cell Sci.* 112:1511-1518.
290. Muramatsu,T., A.Ohmae, and K.Anzai. 1998. BC1 RNA protein particles in mouse brain contain two γ -h-element-binding proteins, translin and a 37 kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:7-11.
291. Muslimov,I.A., E.Santi, P.Homel, S.Perini, D.Higgins, and H.Tiedge. 1997. RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. *J. Neurosci.* 17:4722-4733.
292. Muslimov,I.A., G.Banker, J.Brosius, and H.Tiedge. 1998. Activity-dependent regulation of dendritic BC1 RNA in hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* 141:1601-1611.
293. Nagai,K. 1996. RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:53-61.

294. Nanduri,S., B.W.Carpick, Y.Yang, B.R.Williams, and J.Qin. 1998. Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.* 17:5458-5465.
295. Nanduri,S., B.Carpick, Y.Yang, B.R.Williams, and J.Qin. 1998. ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignment of the 20 kDa double stranded RNA binding domain of PKR. *J. Biomol. NMR.* 12:349-351.
296. Nasmyth,K. and T.Hunt. 1993. Cell cycle. Dams and sluices [news; comment]. *Nature* 366:634-635.
297. Nasmyth,K. 1993. Regulating the HO endonuclease in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:286-294.
298. Nekhai,S., A.Kumar, D.P.Bottaro, and R.Petryshyn. 1996. Peptides derived from the interferon-induced PKR prevent activation by HIV-1 TAR RNA. *Virology* 222:193-200.
299. Neuman-Silberberg,F.S. and T.Schupbach. 1993. The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* 75:165-174.
300. Neuner-Jehle,M., J.P.Denizot, A.A.Borbely, and J.Mallet. 1996. Characterization and sleep deprivation-induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. *J. Neurosci. Res.* 46:138-151.
301. Nicoll,R.A. and R.C.Malenka. 1995. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
302. Nilson,L.A. and T.Schupbach. 1999. EGF receptor signaling in Drosophila oogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 44:203-243.
303. Norvell,A., R.L.Kelley, K.Wehr, and T.Schupbach. 1999. Specific isoforms of squid, a Drosophila hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *Genes Dev.* 13:864-876.
304. Nusslein-Volhard,C., H.G.Frohnhofer, and R.Lehmann. 1987. Determination of anteroposterior polarity in Drosophila. *Science* 238:1675-1681.
305. Ohtsuki,K. and S.Baron. 1978. Regulation of interferon-impaired initiation factor activity in vitro by cAMP and dsRNA. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159:453-457.

306. Oleynikov, Y. and R.H.Singer. 1998. RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol.* 8:381-383.
307. Ouyang, Y., D.Kantor, K.M.Harris, E.M.Schuman, and M.B.Kennedy. 1997. Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J. Neurosci.* 17:5416-5427.
308. Ouyang, Y., A.Rosenstein, G.Kreiman, E.M.Schuman, and M.B.Kennedy. 1999. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19:7823-7833.
309. Pain, V.M. 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 236:747-771.
310. Parada, C.A. and R.G.Roeder. 1996. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* 384:375-378.
311. Park, H., M.V.Davies, J.O.Langland, H.W.Chang, Y.S.Nam, J.Tartaglia, E.Paoletti, B.L.Jacobs, R.J.Kaufman, and S.Venkatesan. 1994. TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:4713-4717.
312. Parkin, N.T., E.A.Cohen, A.Darveau, C.Rosen, W.Haseltine, and N.Sonenberg. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. *EMBO J.* 7:2831-2837.
313. Patel, R.C. and G.C.Sen. 1992. Identification of the double-stranded RNA-binding domain of the human interferon-inducible protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267:7671-7676.
314. Patel, R.C., P.Stanton, N.M.McMillan, B.R.Williams, and G.C.Sen. 1995. The interferon-inducible double-stranded RNA-activated protein kinase self-associates in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8283-8287.
315. Patel, R.C., P.Stanton, and G.C.Sen. 1996. Specific mutations near the amino terminus of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) differentially affect its double-stranded RNA binding and dimerization properties. *J. Biol. Chem.* 271:25657-25663.
316. Patel, R.C. and G.C.Sen. 1998. Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol. Cell Biol.* 18:7009-7019.

317. Patel,R.C. and G.C.Sen. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 17:4379-4390.
318. Pe'ery,T. and M.B.Mathews. 1997. Synthesis and purification of single-stranded RNA for use in experiments with PKR and in cell-free translation systems. *Methods* 11:371-381.
319. Peek,R., G.J.Pruijn, and W.J.van Venrooij. 1996. Interaction of the La (SS-B) autoantigen with small ribosomal subunits . *Eur. J. Biochem.* 236:649-655.
320. Pellizzoni,L., B.Cardinali, N.Lin-Marq, D.Mercanti, and P.Pierandrei-Amaldi. 1996. A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation. *J. Mol. Biol.* 259:904-915.
321. Pettit,D.L., S.Perlman, and R.Malinow. 1994. Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science* 266:1881-1885.
322. Pinol-Roma,S. and G.Dreyfuss. 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355:730-732.
323. Pokrywka,N.J. and E.C.Stephenson. 1995. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* 167:363-370.
324. Polson,A.G. and B.L.Bass. 1994. Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase. *EMBO J.* 13:5701-5711.
325. Preiss,T. and M.W.Hentze. 1999. From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:515-521.
326. Puglisi,J.D., R.Tan, B.J.Calnan, A.D.Frankel, and J.R.Williamson. 1992. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* 257:76-80.
327. Racca,C., M.V.Catania, H.Monyer, and B.Sakmann. 1996. Expression of AMPA-glutamate receptor B subunit in rat hippocampal GABAergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8:1580-1590.
328. Raine,D.A., I.W.Jeffrey, and M.J.Clemens. 1998. Inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by mammalian ribosomes. *FEBS Lett.* 436:343-348.

329. Rana, T.M. and K.T. Jeang. 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:175-185.
330. Rao, A. and O. Steward. 1991. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J. Neurosci.* 11:2881-2895.
331. Rhyu, M.S., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells [see comments]. *Cell* 76:477-491.
332. Richter, J.D. 1991. Translational control during early development. *Bioessays* 13:179-183.
333. Rindler, M.J., I.E. Ivanov, H. Plesken, E. Rodriguez-Boulan, and D.D. Sabatini. 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 98:1304-1319.
334. Rinke, J. and J.A. Steitz. 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* 29:149-159.
335. Romano, P.R., M.T. Garcia-Barrio, X. Zhang, Q. Wang, D.R. Taylor, F. Zhang, C. Herring, M.B. Mathews, J. Qin, and A.G. Hinnebusch. 1998. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell Biol.* 18:2282-2297.
336. Rongo, C., E.R. Gavis, and R. Lehmann. 1995. Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* 121:2737-2746.
337. Rongo, C. and R. Lehmann. 1996. Regulated synthesis, transport and assembly of the Drosophila germ plasm. *Trends. Genet.* 12:102-109.
338. Ross, A.F., Y. Oleynikov, E.H. Kislaukis, K.L. Taneja, and R.H. Singer. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 17:2158-2165.
339. Rounseville, M.P., H.C. Lin, E. Agbottah, R.R. Shukla, A.B. Rabson, and A. Kumar. 1996. Inhibition of HIV-1 replication in viral mutants with altered TAR RNA stem structures. *Virology* 216:411-417.

340. Ruohola,H., K.A.Bremer, D.Baker, J.R.Swedlow, L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1991. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66:433-449.
341. Ryter,J.M. and S.C.Schultz. 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 17:7505-7513.
342. Saffman,E.E., S.Styhler, K.Rother, W.Li , S.Richard, and P.Lasko. 1998. Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Mol. Cell Biol.* 18:4855-4862.
343. Schober,M., M.Schaefer, and J.A.Knoblich. 1999. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts [In Process Citation]. *Nature* 402:548-551.
344. Schuldt,A.J., J.H.Adams, C.M.Davidson, D.R.Micklem, J.Haseloff, D.S.Johnston, and A.H.Brand. 1998. Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev.* 12:1847-1857.
345. Schuman,E.M. 1997. Synapse specificity and long-term information storage. *Neuron* 18:339-342.
346. Schupbach,T. and E.Wieschaus. 1986. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 113:443-448.
347. Schweisguth,D.C., B.S.Chelladurai, A.W.Nicholson, and P.B.Moore. 1994. Structural characterization of a ribonuclease III processing signal. *Nucleic Acids Res.* 22:604-612.
348. Schwemmle,M., M.J.Clemens, K.Hilse, K.Pfeifer, H.Troster, W.E.Muller , and M.Bachmann. 1992. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:10292-10296.
349. Seeger,M.A. and T.C.Kaufman. 1990. Molecular analysis of the bicoid gene from *Drosophila pseudoobscura*: identification of conserved domains within coding and noncoding regions of the bicoid mRNA. *EMBO J.* 9:2977-2987.
350. SenGupta,D.N., B.Berkhout, A.Gatignol, A.M.Zhou, and R.H.Silverman. 1990. Direct evidence for translational regulation by leader RNA and Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:7492-7496.
351. Serano,T.L. and R.S.Cohen. 1995. Gratuitous mRNA localization in the *Drosophila* oocyte. *Development* 121:3013-3021.

352. Severt,W.L., T.U.Biber, X.Wu, N.B.Hecht , R.J.DeLorenzo, and E.R.Jakoi. 1999. The suppression of testis-brain RNA binding protein and kinesin heavy chain disrupts mRNA sorting in dendrites. *J. Cell Sci.* 112:3691-3702.
353. Shamooy,Y., N.Abdul-Manan, and K.R.Williams. 1995. Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic Acids Res.* 23:725-728.
354. Shen,C.P., L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1997. Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 90:449-458.
355. Shen,C.P., J.A.Knoblich, Y.M.Chan, M.M.Jiang, L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1998. Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufer and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12:1837-1846.
356. Siegel,V., T.A.Jongens, L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1993. pipsqueak, an early acting member of the posterior group of genes, affects vasa level and germ cell-somatic cell interaction in the developing egg chamber. *Development* 119:1187-1202.
357. Sik,A., N.Hajos, A.Gulacsi, I.Mody, and T.F.Freund. 1998. The absence of a major Ca²⁺ signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:3245-3250.
358. Sil,A. and I.Herskowitz. 1996. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene [see comments]. *Cell* 84:711-722.
359. Silva,A.J., R.Paylor, J.M.Weihner, and S.Tonegawa. 1992. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [see comments]. *Science* 257:206-211.
360. Silva,A.J., C.F.Stevens, S.Tonegawa, and Y.Wang. 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [see comments]. *Science* 257:201-206.
361. Smith,R. 1992. The basic protein of CNS myelin: its structure and ligand binding. *J. Neurochem.* 59:1589-1608.
362. Sommerville,J. and M.Ladomery. 1996. Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma* 104:469-478.
363. Sommerville,J. and M.Ladomery. 1996. Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB J.* 10:435-443.

364. Sonenberg,N. and A.C.Gingras. 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:268-275.
365. Sorg,B.A., M.M.Smith, and A.T.Campagnoni. 1987. Developmental expression of the myelin proteolipid protein and basic protein mRNAs in normal and dysmyelinating mutant mice. *J. Neurochem.* 49:1146-1154.
366. Southgate,C., M.L.Zapp, and M.R.Green. 1990. Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein. *Nature* 345:640-642.
367. Southgate,C.D. and M.R.Green. 1991. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA- binding site: implications for Tat function. *Genes Dev.* 5:2496-2507.
368. Spana,E.P., C.Kopczynski, C.S.Goodman, and C.Q.Doe. 1995. Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the Drosophila CNS. *Development* 121:3489-3494.
369. Spana,E.P. and C.Q.Doe. 1995. The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in Drosophila. *Development* 121:3187-3195.
370. Srivastava,S.P., M.V.Davies, and R.J.Kaufman. 1995. Calcium depletion from the endoplasmic reticulum activates the double- stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) to inhibit protein synthesis . *J. Biol. Chem.* 270:16619-16624.
371. St Johnston,D., W.Driever, T.Berleth, S.Richstein, and C.Nusslein-Volhard. 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte. *Development* 107 Suppl:13-9:13-19.
372. St Johnston,D., D.Beuchle, and C.Nusslein-Volhard. 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* 66:51-63.
373. St Johnston,D., N.H.Brown, J.G.Gall, and M.Jantsch. 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:10979-10983.
374. St Johnston,D., N.H.Brown, J.G.Gall, and M.Jantsch. 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:10979-10983.
375. St Johnston,D. 1994. RNA localization. Getting to the top. *Curr. Biol.* 4:54-56.
376. St Johnston,D. 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81:161-170.

377. Stebbins-Boaz,B., L.E.Hake, and J.D.Richter. 1996. CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* 15:2582-2592.
378. Steitz,J.A., S.L.Wolin, J.Rinke, I.Pettersson, S.M.Mount, E.A.Lerner , M.Hinterberger, and E.Gottlieb . 1983. Small ribonucleoproteins from eukaryotes: structures and roles in RNA biogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 47 Pt 2:893-900.
379. Stephen,S., N.J.Talbot, and H.Stebbins. 1999. Poly(A) mRNA is attached to insect ovarian microtubules in vivo in a nucleotide-sensitive manner. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43:159-166.
380. Stephenson,E.C., Y.C.Chao, and J.D.Fackenthal. 1988. Molecular analysis of the swallow gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2:1655-1665.
381. Stephenson,E.C. and N.J.Pokrywka. 1992. Localization of bicoid message during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 26:23-34:23-34.
382. Steward,O. and W.B.Levy. 1982. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2:284-291.
383. Steward,O. and P.M.Falk. 1986. Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J. Neurosci.* 6:412-423.
384. Steward,O. and T.M.Reeves. 1988. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J. Neurosci.* 8:176-184.
385. Steward,O., A.Pollack, and A.Rao. 1991. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: time course of appearance of recently synthesized proteins in synaptic junctions. *J. Neurosci. Res.* 30:649-660.
386. Steward,O. and G.A.Banker. 1992. Getting the message from the gene to the synapse: sorting and intracellular transport of RNA in neurons. *Trends. Neurosci.* 15:180-186.
387. Steward,O. 1997. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* 18:9-12.
388. Steward,O., C.S.Wallace, G.L.Lyford, and P.F.Worley. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.

389. Stock,J. 1996. Receptor signaling: dimerization and beyond. *Curr. Biol.* 6:825-827.
390. Struhl,G., K.Struhl, and P.M.Macdonald. 1989. The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 57:1259-1273.
391. Sundell,C.L. and R.H.Singer. 1991. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* 253:1275-1277.
392. Svitkin,Y.V., K.Meerovitch, H.S.Lee, J.N.Dholakia, D.J.Kenan, V.I.Agol, and N.Sonenberg. 1994a. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *J. Virol.* 68:1544-1550.
393. Svitkin,Y.V., A.Pause, and N.Sonenberg. 1994b. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J. Virol.* 68:7001-7007.
394. Takizawa,P.A., A.Sil, J.R.Swedlow, I.Herskowitz, and R.D.Vale. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389:90-93.
395. Tan,E.M. 1989. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93-151.
396. Tan,S.L. and M.G.Katze. 1998. Using genetic means to dissect homologous and heterologous protein- protein interactions of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Methods* 15:207-223.
397. Tan,S.L., M.J.J.Gale, and M.G.Katze. 1998. Double-stranded RNA-independent dimerization of interferon-induced protein kinase PKR and inhibition of dimerization by the cellular P58IPK inhibitor. *Mol. Cell Biol.* 18:2431-2443.
398. Tan,S.L. and M.G.Katze. 1999. The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J. Interferon Cytokine Res.* 19:543-554.
399. Taylor,D.R., S.B.Lee, P.R.Romano, D.R.Marshak, A.G.Hinnebusch, M.Esteban, and M.B.Mathews. 1996. Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. *Mol. Cell Biol.* 16:6295-6302.
400. Theurkauf,W.E. and T.I.Hazelrigg. 1998. In vivo analyses of cytoplasmic transport and cytoskeletal organization during *Drosophila* oogenesis: characterization of a multi-step anterior localization pathway. *Development* 125:3655-3666.

401. Thomis,D.C. and C.E.Samuel. 1993. Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA- dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* 67:7695-7700.
402. Tiedge,H., R.T.J.Fremeau, P.H.Weinstock, O.Arancio, and J.Brosius. 1991. Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:2093-2097.
403. Tiedge,H., W.Chen, and J.Brosius. 1993. Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J. Neurosci.* 13:2382-2390.
404. Tiedge,H., A.Zhou, N.A.Thorn, and J.Brosius. 1993. Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J. Neurosci.* 13:4214-4219.
405. Tiedge,H. and J.Brosius. 1996. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 16:7171-7181.
406. Tiedge,H., F.E.Bloom, and D.Richter. 1999. RNA, whither goest thou? *Science* 283:186-187.
407. Tio,M., M.Zavortink, X.Yang, and W.Chia . 1999. A functional analysis of inscuteable and its roles during Drosophila asymmetric cell divisions. *J. Cell Sci.* 112:1541-1551.
408. Tiwari,R.K., J.Kusari, R.Kumar, and G.C.Sen. 1988. Gene induction by interferons and double-stranded RNA: selective inhibition by 2-aminopurine. *Mol. Cell Biol.* 8:4289-4294.
409. Torre,E.R., E.Loethman, and O.Steward. 1993. Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. *Brain Res.* 631:256-264.
410. Trapp,B.D., T.Moench, M.Pulley, E.Barbosa, G.Tennekoon, and J.Griffin. 1987. Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7773-7777.
411. Uemura,T., S.Shepherd, L.Ackerman, L.Y.Jan, and Y.N.Jan. 1989. numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos. *Cell* 58:349-360.
412. Verhoef,K., M.Tijms, and B.Berkhout. 1997. Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res.* 25:496-502.

413. Visa,N., A.T.Alzhanova-Ericsson, X.Sun, E.Kiseleva, B.Bjorkroth, T.Wurtz, and B.Daneholt. 1996. A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell* 84:253-264.
414. Wang,C. and R.Lehmann. 1991. Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila* [published erratum appears in *Cell* 1992 Mar 20;68(6):1177]. *Cell* 66:637-647.
415. Wang,J., S.Y.Huang, I.Choudhury, M.J.Leibowitz, and S.Stein. 1995. Use of a polyethylene glycol-peptide conjugate in a competition gel shift assay for screening potential antagonists of HIV-1 Tat protein binding to TAR RNA. *Anal. Biochem.* 232:238-242.
416. Wang,P., M.C.Rouyez, S.Ducamp, S.Saragosti, and M.Ventura. 1993. Similarity of the 5' and 3'-TAR secondary structures in HIV-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:565-573.
417. Wang,S. and T.Hazelrigg. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369:400-403.
418. Webster,P.J., J.Suen, and P.M.Macdonald. 1994. *Drosophila virilis* oskar transgenes direct body patterning but not pole cell formation or maintenance of mRNA localization in *D. melanogaster*. *Development* 120:2027-2037.
419. Webster,P.J., L.Liang, C.A.Berg, P.Lasko, and P.M.Macdonald. 1997. Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev.* 11:2510-2521.
420. Weiler,I.J. and W.T.Greenough. 1993. Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:7168-7171.
421. West,D.K. and C.Baglioni. 1979. Induction of interferon in HeLa cells of a protein kinase activated by double-stranded RNA. *Eur. J. Biochem.* 101:461-468.
422. Wickens,M. 1990. In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends. Biochem. Sci.* 15:320-324.
423. Wickham,L., T.Duchaine, M.Luo, I.R.Nabi , and L.DesGroseillers. 1999. Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* 19:2220-2230.
424. Williams,B.R., C.S.Gilbert, and I.M.Kerr. 1979. The respective roles of the protein kinase and pppA₂' p₅' A₂' p₅' A- activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res.* 6:1335-1350.

425. Wilsch-Brauninger, M., H. Schwarz, and C. Nusslein-Volhard. 1997. A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* 139:817-829.
426. Wodarz, A., A. Ramrath, U. Kuchinke, and E. Knust. 1999. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts [In Process Citation]. *Nature* 402:544-547.
427. Wong, M.L. and Y.R. Yen. 1998. Protein synthesis in pseudorabies virus-infected cells: decreased expression of protein kinase PKR, and effects of 2-aminopurine and adenine. *Virus Res.* 56:199-206.
428. Wu-Baer, F., W.S. Lane, and R.B. Gaynor. 1995. The cellular factor TRP-185 regulates RNA polymerase II binding to HIV-1 TAR RNA. *EMBO J.* 14:5995-6009.
429. Wu-Baer, F., D. Sigman, and R.B. Gaynor. 1995. Specific binding of RNA polymerase II to the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA is regulated by cellular cofactors and Tat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:7153-7157.
430. Wu, C., Y. Ohmori, S. Bandyopadhyay, G. Sen, and T. Hamilton. 1994. Interferon-stimulated response element and NF kappa B sites cooperate to regulate double-stranded RNA-induced transcription of the IP-10 gene. *J. Interferon Res.* 14:357-363.
431. Wu, F.K., J.A. Garcia, D. Harrich, and R.B. Gaynor. 1988. Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1. *EMBO J.* 7:2117-2130.
432. Wu, G.Y. and H.T. Cline. 1998. Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science* 279:222-226.
433. Wu, L., D. Wells, J. Tay, D. Mendis, M.A. Abbott, A. Barnitt, E. Quinlan, A. Heynen, J.R. Fallon, and J.D. Richter. 1998. CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses [see comments]. *Neuron* 21:1129-1139.
434. Wu, S. and R.J. Kaufman. 1996. Double-stranded (ds) RNA binding and not dimerization correlates with the activation of the dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *J. Biol. Chem.* 271:1756-1763.
435. Wu, S. and R.J. Kaufman. 1997. A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 272:1291-1296.

436. Wu,S., K.U.Kumar, and R.J.Kaufman. 1998. Identification and requirement of three ribosome binding domains in dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochemistry* 37:13816-13826.
437. Wu,X.Q., S.Lefrancois, C.R.Morales, and N.B.Hecht. 1999. Protein-protein interactions between the testis brain RNA-binding protein and the transitional endoplasmic reticulum ATPase, a cytoskeletal gamma actin and Trax in male germ cells and the brain. *Biochemistry* 38:11261-11270.
438. Wu,X.Q., P.Petrusz, and N.B.Hecht. 1999. Testis-brain RNA-binding protein (Translin) is primarily expressed in neurons of the mouse brain. *Brain Res.* 819:174-178.
439. Xiao,Q., T.V.Sharp, I.W.Jeffrey, M.C.James, G.J.Pruijn, W.J.van Venrooij, and M.J.Clemens. 1994. The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* 22:2512-2518.
440. Xu,X., P.X.Xu, and Y.Suzuki. 1994. A maternal homeobox gene, *Bombyx caudal*, forms both mRNA and protein concentration gradients spanning anteroposterior axis during gastrulation. *Development* 120:277-285.
441. Yisraeli,J.K., S.Sokol, and D.A.Melton. 1990. 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.
442. Yoo,C.J. and S.L.Wolin. 1994. La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. *Mol. Cell Biol.* 14:5412-5424.
443. Yoo,C.J. and S.L.Wolin. 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* 89:393-402.
444. Zamanian-Daryoush,M., S.D.Der, and B.R.Williams. 1999. Cell cycle regulation of the double stranded RNA activated protein kinase, PKR. *Oncogene* 18:315-326.
445. Zhang,H.L., R.H.Singer, and G.J.Bassell. 1999. Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J. Cell Biol.* 147:59-70.
446. Zhang,W., J.D.Johnson, and W.J.Rutter. 1993. Association and phosphorylation-dependent dissociation of proteins in the insulin receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:11317-11321.

447. Zhou,Q. and P.A.Sharp. 1995. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *EMBO J.* 14:321-328.
448. Zhu,S., P.R.Romano, and R.C.Wek. 1997. Ribosome targeting of PKR is mediated by two double-stranded RNA- binding domains and facilitates in vivo phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2. *J. Biol. Chem.* 272:14434-14441.
449. Zou,D.J. and H.T.Cline. 1999. Postsynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is required to limit elaboration of presynaptic and postsynaptic neuronal arbors. *J. Neurosci.* 19:8909-8918.

Annexes

Annexe

Cette annexe existe afin d'informer le lecteur de la difficulté, voire même de l'*impossibilité*, d'effectuer des analyses statistiques sur les résultats de cette étude. En effet, puisque le taux basal ainsi que la stimulation de la traduction sont quantifiables, il en découle qu'il serait souhaitable, dans le but d'examiner avec rigueur scientifique les hypothèses avancées, de soumettre ces résultats obtenus à une analyse statistique.

Cependant, les résultats obtenus sont inadéquats pour ce type d'analyse: bien que les essais de traduction ait été répété plusieurs fois, chaque expérience n'a pas fourni le même degré de stimulation ou bien l'effet maximal n'est pas survenu à la même quantité de protéine ajoutée. Bien que ceci pourrait être indicatif d'un phénomène non spécifique, nous croyons qu'un détail d'ordre technique peut expliquer cette non-reproductibilité.

Plusieurs essais de traduction ont été fait avant que ne soit décidé d'évaluer la conformation native de la protéine par un essai de liaison en solution à une sonde d'ARN *bcd*. Aussi, nous croyons qu'il serait possible que plusieurs des préparations de protéines utilisées contenait peu ou pas de protéine native. En effet, des essais de liaison en solution entrepris avec une sonde d'ARN *bcd* ont par la suite démontré que ces préparations présentaient un Kd de liaison très faible ou bien ne présentaient aucune liaison. Ceci suggère que les variations obtenues avec ces préparations de protéine seraient causés par une variation au niveau de la quantité de protéine soluble effective et non d'un effet non-spécifique.

Dans les pages suivantes, le lecteur pourra examiner les résultats de différentes expériences d'essais de traduction entreprises *avant* que ne soit pas prise la décision d'effectuer des essais de liaison à l'ARN *bcd*. Sur chaque page le lecteur pourra également examiner un graphique qui représente un essai de liaison intenté quelques temps après. Ces essais de liaison permettent de conclurent que les essais de traduction respectifs ne sont pas valables puisque les

préparations de protéine HFBDQ utilisées ne présentent pas d'affinité pour l'ARN *bcd*. Il n'est malheureusement arrivé qu'une seule fois qu'une préparation de protéine a présenté de l'affinité pour l'ARN *bcd* et il s'agit de celle à l'origine des résultats présentés dans le présent mémoire.

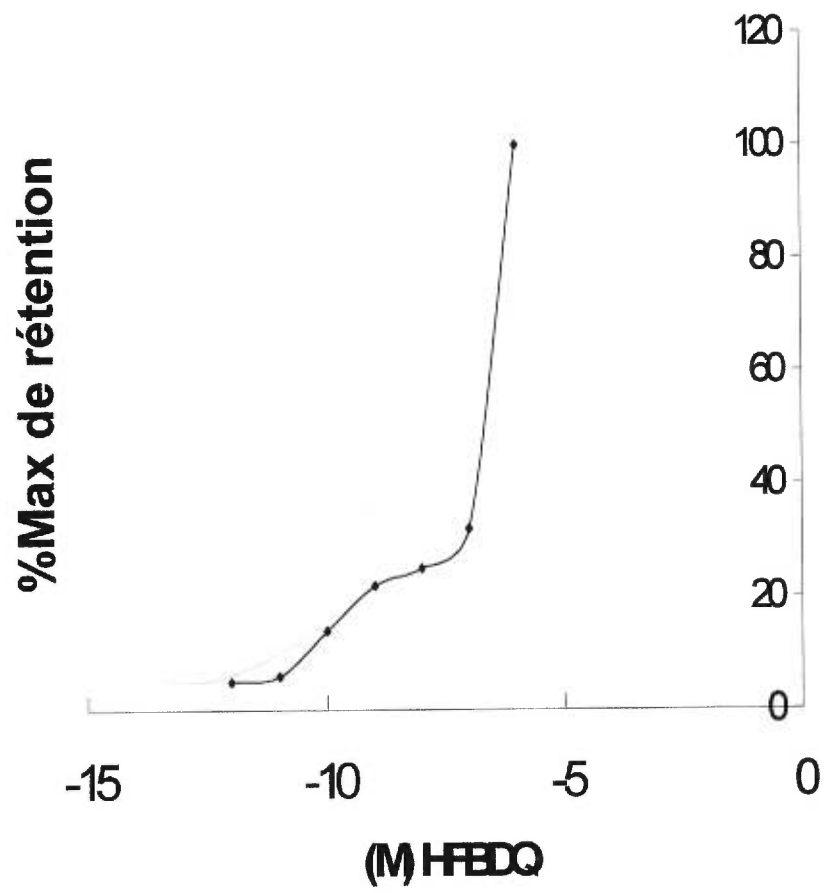
Annexe 1

Autoradiogramme d'un essai de traduction en présence de Mét[S³⁵]. L'ARN TARCAT est traduit en présence de HFBDQ avec ou sans l'ajout de 10 mM 2-AP. On peut observer que la préparation de HFBDQ utilisée dans cet essai n'a aucun effet significatif sur la traduction. Cependant tel qu'observé dans le graphique du bas, cette préparation de HFBDQ présente peu d'affinité pour de l'ARN dans un essai de liaison en solution. La sonde utilisée consiste en l'élément du 3'UTR de l'ARNm *bcd* marqué au P³².

2-AP



[HFBDQ]
(nM)



Annexe 2

Graphiques de la traduction de l'ARN TARCAT en fonction de la quantité rajoutée en HFBDQ; chaque graphique représente des essais indépendants avec des préparations de HFBDQ différentes. L'essai ELISA anti-CAT est utilisé pour la quantification de la protéine CAT traduite. On remarque pour ces essais de traduction, que l'ajout de HFBDQ stimule la traduction d'un facteur de 2-3 fois. On peut observer que la quantité de HFBDQ à laquelle un effet maximal est obtenu varie selon la préparation utilisée. Les essais de liaison d'ARN en solution démontrent également une variation au niveau de l'affinité des différentes préparations pour la sonde *bcd*, mais aucune ne présente d'affinité semblable à celle obtenue pour la figure 1.

