

Université de Montréal

**Identification de protéines impliquées dans la localisation des ARNm au niveau de
l'appareil mitotique.**

Par

Sulin Oré Rodriguez

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Biochimie
option Cheminement libre

Avril 2016

© Sulin Oré Rodriguez, 2016

Résumé

La localisation des ARNm au niveau des microtubules et des centrosomes laisse voir le centrosome et le fuseau mitotique comme des complexes ribonucléoprotéiques. Cependant, le mécanisme de localisation des ARNm à ces différentes structures ainsi que leurs fonctions dans la régulation de la mitose restent encore incompris. L'objectif était ici de caractériser des protéines de liaison à l'ARN (RNA Binding Proteins, RBPs) fonctionnellement impliquées dans la localisation des ARNm mitotiques chez la *Drosophile* et d'évaluer la conservation de la fonction de ces RBPs dans les cellules humaines. La déplétion de RBPs par RNAi générée dans des *Drosophiles* mutantes résulte en des phénotypes distincts de localisation anormale de l'ARNm centrosomique *cen* et en des défauts mitotiques différents selon le RBP ciblé, suggérant des fonctions différentes de ces RBPs. De plus, dans les jeunes embryons, les RBPs Bru-2 et Mask semblent être fonctionnellement importants pour la mitose via la régulation de l'ARNm *cen*, donnant un aperçu de la possible fonction mitotique de RBPs dans la régulation d'un ARN centrosomique. De plus, il a été observé dans un criblage d'immunofluorescence dans des cellules HeLa en métaphase que HNRNPUL1 colocalise au fuseau et aux centrosomes. HNRNPUL1 pourrait être impliqué dans la régulation de l'ARNm *CDR2* (orthologue de *cen*) puisque la déplétion de l'orthologue de HNRNPUL1 dans la *Drosophile*, CG30122, résulte en une localisation anormale de l'ARNm centrosomique *cen*.

Mots clés : Localisation d'ARNm, *cen*, ARNm centrosomiques, RBPs mitotiques, *Drosophile*

Abstract

The localization of mRNA to microtubules and centrosomes has led to the suggestion that the centrosome and mitotic spindle are in fact ribonucleoprotein complexes. However, the mechanism of mRNA localization to those structures and its functional contribution in mitosis regulation remain poorly characterized. The objectives here were to identify RNA Binding Proteins (RBPs) involved in mitotic mRNA localization in *Drosophila* and to assess the conservation of the function of these RBPs in human cells. RNAi-mediated RBP depletion in *Drosophila* mutants leads to distinct phenotypes of abnormal localization of the centrosomal *cen* mRNA, and to different mitotic defects depending on the targeted RBP, suggesting different functions for these RBPs. Moreover, in young embryos, Bru-2 and Mask RBPs seem to be functionally important for mitosis through *cen* mRNA regulation, giving insight into a possible RBP mitotic function in regulating a centrosomal mRNA. In addition, data from an immunofluorescence screen on HeLa cells at metaphase suggests that HNRNPUL1 colocalizes to the spindle and centrosomes. HNRNPUL1 may be involved in the regulation of *CDR2* mRNA (*cen* ortholog) because depletion of the HNRNPUL1 ortholog in flies, CG30122, disrupted *cen* mRNA localization.

Key words : mRNA localization, *cen*, centrosomal mRNA, mitotic RBPs, *Drosophila*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	x
Introduction.....	1
Impact biologique et fonctions de la localisation des ARNm	1
Mécanismes de localisation des ARNm	6
Les ARNm dans le cycle cellulaire.....	7
Localisation des ARNm au niveau des microtubules mitotiques	12
Localisation des ARNm au niveau des centrosomes	15
<i>Le cycle du centrosome.....</i>	<i>15</i>
<i>Le centrosome dans la régulation du cycle cellulaire.....</i>	<i>16</i>
<i>Ciblage des ARNm aux centrosomes</i>	<i>19</i>
Aberrations centrosomiques et maladies humaines.....	21
La <i>Drosophile</i> comme modèle pour étudier la mitose.....	22
Problématique, hypothèse et objectifs	25
Matériel et Méthodes.....	29

Résultats.....	36
Identification de RBPs impliqués dans le ciblage de l'ARNm <i>cen</i> au centrosome.....	36
<i>Profil de localisation de l'ARNm <i>cen</i></i>	<i>36</i>
<i>RNAi dans les embryons de Drosophile</i>	<i>37</i>
<i>Expression des RBPs soumis au RNAi dans les embryons mutants</i>	<i>39</i>
<i>Viabilité des mutants RBP-RNAi</i>	<i>41</i>
<i>Localisation de <i>cen</i> et phénotypes mitotiques dans les embryons RBP-RNAi</i>	<i>42</i>
Évaluation du profil de localisation de RBPs par criblage IF	46
Discussion	52
Régulation de l'ARNm <i>cen</i> et effet sur la mitose.....	52
Localisation des RBPs dans les cellules humaines	61
Conclusion	64
Références.....	65
Annexe.....	xi

Liste des tableaux

Tableau I. Liste de RBPs possiblement impliqués dans la localisation d'ARNm au niveau de l'appareil mitotique.....	27
Tableau II. Compilation des phénotypes observés dans les embryons mutants de <i>Drosophila melanogaster</i> dans lesquels les RBPs sont soumis au RNAi.....	51

Liste des figures

Figure 1. Exemples de la localisation des ARNm.....	3
Figure 2. Trois mécanismes de localisation des ARNm.....	7
Figure 3. Schématisation des premiers stades d'embryogenèse chez la <i>Drosophila</i>	24
Figure 4. ARNm localisés au niveau de l'appareil mitotique chez la <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Figure 5. L'ARNm centrosomique <i>cen</i> est présent durant tout le cycle cellulaire dans les jeunes embryons de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Figure 6. RNAi dans les embryons de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Figure 7. Quantification par RT-qPCR de l'expression des RBPs soumis au RNAi dans les embryons mutants de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Figure 8. Viabilité embryonnaire selon le RBP soumis au RNAi dans les mutants de <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Figure 9. Localisation de l'ARNm <i>Cen</i> durant la métaphase analysée par FISH dans les jeunes embryons de <i>Drosophila melanogaster</i> dont les RBPs sont soumis au RNAi	44
Figure 10. Effets mitotiques analysés par IF dans les jeunes embryons mutants de <i>Drosophila melanogaster</i> dont les RBPs sont soumis au RNAi.....	45
Figure 11. Méthodologie pour l'analyse du crible IF sur les cellule HeLa.....	48
Figure 12. Profil de localisation des 182 RBPs analysée par criblage IF dans des cellules HeLa	49
Figure 13. RBPs montrant une localisation au niveau du fuseau mitotique et/ou du centrosome dans les cellules HeLa	50

Liste des abréviations

a2bp1 : Ataxin-2 binding protein 1

ADNc : ADN complémentaire

AKAP1 : A-kinase anchoring protein 1

APC/C : Anaphase promoting complex/cyclosome (complexe de promotion de l'anaphase)

aret : arrest

ARNm : ARN messenger

Atxn2 : Ataxin 2

BAC : Bacterial Artificial Chromosome (Chromosome bactérien artificiel)

bem : bemused

Bol : Boule

Bru-2 : Bruno 2

Bru-3 : Bruno 3

Bsg25D : Blastoderm-specific gene 25D

CCDC86 : Coiled-coil domain containing 86

CDC40 : Cell division cycle 40

CDR2 : Cerebellar degeneration related protein 2

Cen : Centrocortin

CLS: Centrosome localization signal (signal de localisation aux centrosomes)

CPE : Cytoplasmic polyadenylation element (élément cytoplasmique de polyadénylation)

CycB : Cycline B

DIG : Digoxigénine

Fib : Fibrillarin

FISH : Fluorescent in situ hybridization (hybridation in situ à fluorescence)

Fne : found in neurons

Ge-1 : Ge-1 ortholog

GGT : G1-G2 Tether (attache G1-G2)

Heph : Hephaestus

hnRNPs : Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes)

HNRNPUL1 : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U like 1

hpRNA : Hairpin RNA (ARN en épingle à cheveux)

IP : immunoprécipitation

IRES : Internal Ribosome Entry Site (Site interne d'entrée des ribosomes)

ITAFs : IRES trans-acting factors (facteurs trans des IRES)

Mask : Multiple ankyrin repeats single KH domain

MBT : Midblastula transition (transition mid-blastuléenne)

me31B : Maternal expression at 31B

MTOC : Microtubule organizing center (centre organisateur des microtubules)

NUSAP1 : Nucleolar and spindle associated protein 1

ovt : ovarette

PCM : Pericentriolar material (matériel péricentriolaire)

Pum : Pumilio

qKr54B : quaking related 54B

qKr58E-2 : quaking related 58E-2

qPCR : quantitative polymerase chain reaction (PCR quantitative)

RBMX2 : RNA binding motif protein, X-linked 2

Rbp9 : RNA binding protein 9

RBPs : RNA binding proteins (protéines de liaison à l'ARN)

rin : Rasputin

RNAi : RNA interference (interférence aux ARN)

Rnp4f : RNA-binding protein 4F

RNPs : Ribonucleoprotein complexes (complexes ribonucléoprotéiques)

RPS3 : Ribosomal protein S3

RT : reverse transcription

SF2 : Splicing factor 2

siRNA : small interfering RNA (petit ARN interférant)

SML : S-M Linker (lien S-M)

Tbph : TAR DNA-binding protein-43 homolog

TSA : Tyramide signal amplification (amplification du signal par la tyramide)

uORF : Upstream open reading frame (cadre de lecture ouvert en amont)

VDRC : Vienna Drosophila RNAi center

WDR43 : WD repeat domain 43

WT : Wild type (phénotype sauvage)

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Éric Lécuyer pour m’ avoir accueilli au sein de son équipe et pour la confiance qu’ il a placée en moi en me laissant entreprendre ce projet. Son encadrement, recommandations et conseils ont été très formateurs. Je tiens également à remercier les Fonds de recherche en santé du Québec pour l’ appui financier. Mes remerciements vont aussi à mes collègues de laboratoire qui ont été une source inestimable d’ aide et de support et qui ont su rendre ce parcours un des plus agréables. J’ aimerais également remercier mes camarades de classes avec lesquels j’ ai pu partager des très beaux moments. Finalement, un grand merci à ma famille qui a toujours été disponible pour moi et pour leurs inépuisables encouragements tout au long de la complétion de mes études de maîtrise.

Introduction

Pendant de nombreuses années, le rôle de l'ARN messenger (ARNm) dans la régulation de l'expression génique a été largement sous-estimé. En effet, initialement caractérisé comme simple intermédiaire entre le gène et la protéine, l'ARNm s'est par la suite avéré être soumis à une succession d'étapes de régulation finement contrôlées, appelée régulation post-transcriptionnelle, cruciale pour l'expression adéquate de la protéine finale correspondante. Ainsi, après transcription, l'épissage, l'édition, la polyadénylation à l'extrémité 3' et l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' mènent à l'obtention d'un ARNm mature qui sera relocalisé au cytoplasme où il est traduit en protéine [1]. La traduction peut subvenir immédiatement après l'export du transcrit ou peut n'avoir lieu qu'à la suite du ciblage de ce dernier dans un compartiment spécifique de la cellule. Ce phénomène de localisation des ARNm, jusqu'à récemment peu revisité, semblait ne concerner que très peu d'ARNm et être un mécanisme peu fréquent. Aujourd'hui, par contre, la localisation des ARNm semble être un phénomène prévalent pour lequel les rôles fonctionnels restent à caractériser.

Impact biologique et fonctions de la localisation des ARNm

Les premières expériences où le rôle de la localisation des ARNm a été mis en évidence se sont faites chez les insectes, amphibiens et les ascidies. Après la découverte de l'importance du dépôt d'ARN maternel pour le destin cellulaire dans les embryons, vint l'observation que ces ARNm se localisent asymétriquement [2]. Ainsi, la traduction ciblée de ces transcrits maternels tels *gurken*, *bicoid*, *oskar* et *nanos* permet d'établir les axes embryonnaires antéro-postérieur et dorso-ventral, respectivement, chez la *Drosophile*, par exemple [3]. Chez le *Xénope*, la

localisation des ARNm *Vg1*, *VegT* et *Xwnt11* dans le pôle végétal dicte l'établissement du mésoderme et de l'endoderme ainsi que l'axe gauche-droit dans l'embryon [4] (**fig. 1**). Chez les ascidies, la localisation des ARNm *macho1* et *pem* est nécessaire pour l'établissement des axes antérieur et dorsal, respectivement, ainsi que pour dicter la différenciation musculaire lors de l'embryogenèse [5, 6].

Au-delà de la localisation embryonnaire des ARNm, également rapportée dans d'autres organismes tels le poisson zèbre, les spiraliens, les cnidariens, et les arthropodes, il a été observé que les ARNm se trouvent aussi localisés dans les cellules différenciées [2]. L'ARNm *β -actine*, par exemple, est localisé aux lamellipodes des cellules migratoires tels les fibroblastes et myoblastes où sa traduction ciblée est importante pour la polymérisation rapide des filaments d'actine requise pour la motilité cellulaire dirigée [7]. Les neurones matures des mammifères présentent également une localisation dendritique de l'ARNm *CamKII α* impliquée dans la plasticité synaptique [8]. Ainsi, la localisation de l'ARNm à des endroits distants spécifiques de la cellule participe à son adaptation adéquate dans son environnement. Dans une autre optique, la localisation des ARNm peut aussi contribuer à définir l'asymétrie cellulaire, notamment lors de la mitose. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, le transcrit *Ash1* se trouve ciblé spécifiquement à la cellule fille générée par bourgeonnement où sa traduction localisée permettra de définir un destin cellulaire différent de celui de la cellule mère [9] (**fig. 1**). Chez la souris, il a été observé que seulement la population de cellules souches contenues dans le blastocyste, mais non les cellules du trophoctoderme, exprimait l'ARNm *Cdx2*, montrant que le ciblage différentiel des ARNm permet également la spéciation de destins cellulaires différents importants pour le développement [10].

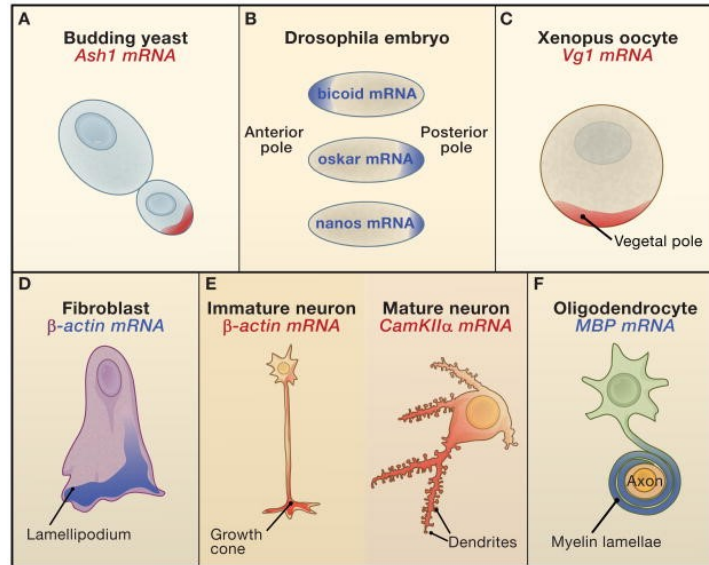


Figure 1. Exemples de la localisation des ARNm. *A.* Chez la levure *S. cerevisiae* l'ARNm *Ash1* est ciblé et traduit localement dans la cellule fille. *B.* La traduction ciblée de transcrits *bicoid*, *oskar* et *nanos* mène à l'établissement de l'axe antéro-postérieur dans l'embryon de *Drosophile*. *C.* Le transcrit *Vg1* est localisé au pôle végétal dans l'oocyte de la *Xénope* où il contribuera à la formation du mésoderme. *D.* L'ARNm *β-actine* est localisé aux lamellipodes des cellules migratoires tel le fibroblaste ainsi qu'aux cônes de croissance des neurones immatures (*E*). *E.* Le transcrit *CamKIIα* est ciblé aux dendrites des neurones matures où il sera impliqué dans la plasticité synaptique. *F.* Le transcrit *MBP* est acheminé vers les sites de myélinisation dans les oligodendrocytes. Image prise de Martin et Ephrussi. 2009. *Cell* [11].

Jusqu'à maintenant, les exemples montraient une localisation subcellulaire des ARNm, cependant, le ciblage extracellulaire des transcrits a aussi été observé. Chez la plante, en plus de la localisation des ARNm aux chloroplastes et dans certaines régions du réticulum endoplasmique, certains transcrits, tel que *GAIP* en association avec la protéine RBP50, sont transportés à travers les plasmodesmes, à l'extérieur de la cellule, dans le système vasculaire de la plante où ils peuvent être relocalisés sur de longues distances [12, 13]. Il a également été observé que les vésicules extracellulaires, ou exosomes, relâchés par des mastocytes humains et de souris contenaient ~1300 ARNm pouvant être fonctionnels dans leur nouvelle localisation

une fois le contenu exosomal déversé dans une autre cellule, suggérant que la localisation extracellulaire des ARNm jouerait un rôle dans la communication intercellulaire [14].

Ainsi, la localisation des ARNm a été démontrée comme étant un phénomène présent dans la plupart des organismes vivants, de la plante à l'Homme en passant par les invertébrés, les bactéries ou encore les mollusques. Étant un mécanisme hautement conservé, il peut être considéré que le ciblage des transcrits remplit un rôle essentiel dans le maintien d'un organisme. En effet, la localisation des ARNm, en régulant l'expression spatio-temporelle d'un gène, pourrait conférer plusieurs avantages à la cellule. Premièrement, puisqu'une même copie d'ARNm peut être traduite plusieurs fois, la localisation d'un transcrit représente un avantage énergétique en comparaison au transport de plusieurs protéines déjà produites dans un site distant [11]. Cette économie énergétique serait considérable si on tient compte du fait que, en moyenne, 2 800 copies de protéine peuvent être synthétisées à partir d'un seul transcrit d'ARNm, tel que mesuré dans une étude sur 5 000 gènes dans des fibroblastes de souris par marquage isotopique couplé à la spectrométrie de masse [15]. Deuxièmement, la localisation des ARNm permet de cibler la traduction d'un transcrit, ce qui préviendrait qu'une protéine soit malencontreusement localisée dans un environnement où elle serait inutile ou nocive pour la cellule [16]. Troisièmement, il a été démontré que la localisation des ARNm pouvait être induite par un stress extracellulaire et que la cellule pouvait stocker des transcrits jusqu'au moment où la traduction des ARNm serait initiée en réponse à un signal spécifique [2]. Prises conjointement, ces observations proposent que la localisation des ARNm serait un mécanisme important de régulation spatio-temporelle de l'expression d'un gène en réponse à un stimulus, permettant ainsi à la cellule de s'adapter rapidement face à un changement de son microenvironnement [17]. Quatrièmement, il a été observé que divers ARNm codant pour des

protéines formant un même complexe possèdent souvent des patrons de localisation semblables [18]. Et des analyses de modélisation mathématique proposent que dans des cellules ayant un grand volume, tel les ovocytes de *Drosophila*, l'assemblage de complexes protéiques fonctionnels ne serait pas favorable par simple diffusion des protéines, puisque le taux d'interactions entre protéines résultant de ce mécanisme est faible [19]. À cet égard, il a été proposé que la colocalisation de différents transcrits puisse assurer la co-traduction de ces ARNm, favorisant l'assemblage efficace du complexe protéique [20]. Cinquièmement, la production *de novo* des protéines au site de ciblage permettrait la synthèse de protéines possédant des modifications post-traductionnelles différentes des protéines déjà présentes, menant à la formation de complexes protéiques avec des propriétés et activités diverses [17]. Finalement, des études récentes introduisent l'existence de fonctions non-codantes pour les ARNm. En effet, certains transcrits sembleraient jouer un rôle dans le repliement des protéines afin de former des structures complexes [21, 22].

À la lumière des avantages énumérés précédemment, il devient plus clair comment la localisation des ARNm survient comme un mécanisme crucial dans divers événements physiologiques tels que l'établissement de la polarité cellulaire et de l'axe embryonnaire, dans la plasticité synaptique ainsi que dans la motilité cellulaire [11]. En appui à l'ampleur de la localisation des ARNm dans les divers processus où ce phénomène est impliqué, une étude a démontré par une analyse d'hybridation *in situ* à fluorescence (fluorescent *in situ* hybridization; FISH) que, parmi ~3000 ARNm étudiés dans les embryons de la *Drosophila*, >70% se localisent dans des patrons qui corrélaient fortement avec la distribution et la fonction des protéines encodées [23], soulignant davantage l'importance et la prévalence de ce phénomène.

Mécanismes de localisation des ARNm

La localisation des ARNm, comme tous les autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, implique deux éléments principaux : les éléments *Cis*-régulateurs se trouvant dans l'ARNm et les éléments *Trans*-régulateurs tels que les protéines de liaison aux ARN (RNA Binding Proteins; RBPs) qui reconnaissent les éléments *Cis*. Les éléments *Cis* sont en fait des séquences faisant partie intégrante du transcrite et se trouvent généralement dans la région 3'-UTR de l'ARNm, bien que certains aient été identifiés dans la région 5'-UTR ainsi que dans la région codante [24, 25]. Ces éléments *Cis* sont caractérisés non seulement par leur séquence nucléique primaire, mais également par la structure secondaire et/ou tertiaire qu'ils forment [11]. Des expériences suggèrent que certains ARNm peuvent contenir plusieurs éléments *Cis* agissant de manière redondante ou ayant une fonction complémentaire [26].

L'association entre les RBPs et les éléments *Cis* mène à la formation des complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) essentiels au transport de l'ARNm jusqu'à sa destination finale [27]. Trois mécanismes majeurs sont généralement considérés pour la localisation des transcrits : la diffusion aléatoire des ARNm en combinaison à leur capture localisée, le transport des transcrits médié par le cytosquelette, et une dégradation générale des transcrits en combinaison avec une protection ciblée de l'ARNm d'intérêt (**fig. 2**) [28]. Le mécanisme prépondérant permettant une localisation efficace est celui par lequel l'ARNm est pris en charge par les RBPs directement après la transcription dans le noyau puis exporté dans le cytoplasme où le RNP formé se lie à des moteurs protéiques associés au cytosquelette, permettant son transport. Le recrutement de protéines inhibitrices de la traduction permettrait également au

RNP de garder le transcrit sous une forme silencieuse et ainsi de prévenir la dégradation de l'ARNm [2].

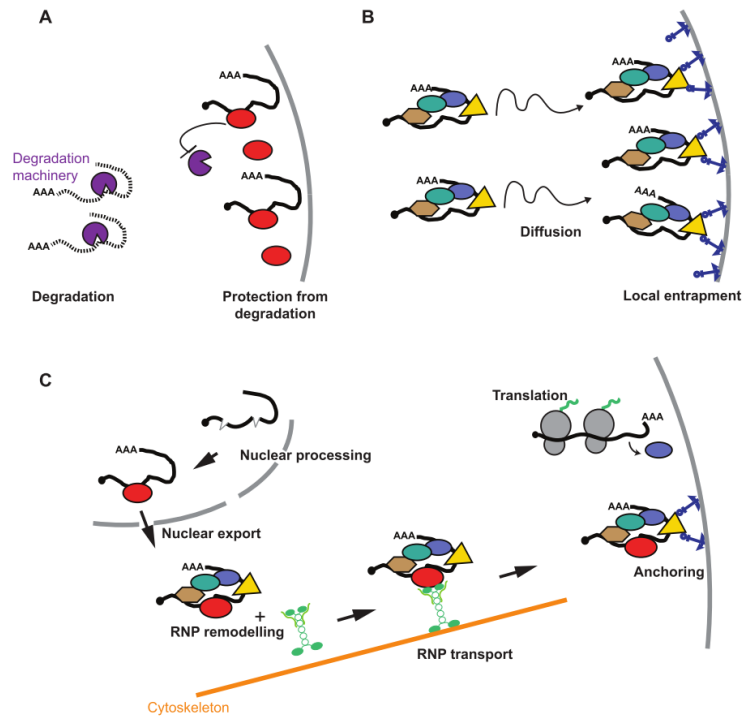


Figure 2. Trois mécanismes de localisation des ARNm. *A.* Dégradation générale des transcrits en combinaison avec une protection ciblée de l'ARNm d'intérêt. *B.* Diffusion aléatoire des ARNm en combinaison à leur capture localisée. *C.* Transport des transcrits médiée par le cytosquelette. Image prise de Medioni et al. 2012. *Development* [28].

Les ARNm dans le cycle cellulaire

Comme mentionné précédemment, le ciblage des ARNm dans des compartiments spécifiques aurait comme avantage la production localisée de complexes protéiques qui permettraient de répondre de manière plus efficace au besoin de la cellule. Cela serait particulièrement crucial dans le cas de la progression dans le cycle cellulaire qui nécessite une

orchestration rapide et précise de multiples composants et où, par conséquent, la régulation traductionnelle devient plus pertinente que la régulation transcriptionnelle pour pourvoir les protéines requises [29].

Outre la reconnaissance par les RBPs des éléments *Cis*-régulateurs dans la région 3'-UTR et dans la région codante des ARNm, la régulation de certains transcrits est également assujettie à la région 5'-UTR, comme c'est le cas pour la formation de certains RNPs impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Chez la levure *S. cerevisiae*, en stimulant la synthèse de la cycline Cln3 durant la phase G1, le facteur d'initiation de la traduction Cdc33 (homologue d'eIF4E chez l'humain) contribue à la transition G1-S [29]. Le transcrit *Cln3* comprend dans sa région 5'-UTR un élément répressif identifié comme un cadre de lecture ouvert trouvé en amont (upstream open reading frame, uORF). Cet uORF limite normalement le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction, cependant, dans un milieu riche en nutriments où la concentration de ces facteurs est augmentée, cette répression est contrecarrée, ce qui se traduit par une entrée plus rapide dans la phase S [29]. Dans les cellules HeLa, la transition G1-S se fait également par régulation de l'ARNm d'une cycline. Le transcrit *cycline E1* possède un contenu élevé en guanine et cytosine dans sa région 5'-UTR pouvant former une structure secondaire. Puisqu'il a été observé par des études de « rescue » que l'expression de la protéine cycline E1 rétablit la progression du cycle cellulaire arrêté en G1 lorsque DDX3 est réprimé, cette cycline a été proposée comme la cible principale de DDX3 [30]. DDX3, un membre de la famille des ARN hélicase à boîte DEAD, serait capable de défaire la structure secondaire de *cycline E1*, permettant le recrutement de facteurs d'initiation de la traduction [30].

Chez la levure *S. pombe*, la transition G2-M implique également l'activité d'une ARN hélicase à boîte DEAD, eIF4A. Il a été observé que l'arrêt à la phase G2 se produisant dans les mutants eIF4A peut être levé par la surexpression de Cdc25. Cette enzyme a donc été proposée comme étant la cible d'eIF4A. Et l'association de eIF4A à Cdc25 permettrait la traduction de Cdc25. En effet, l'activité hélicase d'eIF4A déferait les uORF ainsi que les structures en épingle à cheveux trouvées dans la longue région 5'-UTR de l'ARNm *Cdc25* qui empêchent normalement la liaison des facteurs d'initiation de la traduction [29].

Les transitions G1-S et G2-M impliquent aussi la polyadénylation des régions 3'-UTR de certains ARNm. Deux protéines, CPEB1 et CPEB4, sont impliquées dans ce processus et sont notamment importantes pour la polyadénylation d'ARNm codant pour des facteurs requis dans la transition G2-M. Le rallongement des queues poly-A se fait ainsi par l'intermédiaire de CPEB1 et CPEB4 qui reconnaissent les éléments cytoplasmiques de polyadénylation (cytoplasmic polyadenylation element, CPE) dans les régions 3'-UTR des transcrits pour induire le recrutement de la poly-A polymérase [29]. Seulement certains ARNm tels *mos*, *cycline B1*, *cycline A1* et *cdk1* étaient connus pour avoir leur queue poly-A rallongée [31]. Cependant, une étude à l'échelle du génome dans des cellules HeLa synchronisées à plusieurs phases du cycle cellulaire a montré que 349 ARNm étaient davantage polyadénylés dans la phase S que lors de la transition G2-M, et que 222 ARNm étaient plus polyadénylés à la transition G2-M qu'à la phase S [32]. Les ARNm en question codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, cette expérience suggérait que la polyadénylation différentielle des transcrits joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, plus spécifiquement pour l'entrée en mitose [32].

Tout comme les variations dans la région 3'-UTR des ARNm pourraient influencer la régulation de la mitose, la composition différentielle de la région 5'-UTR pourrait également avoir un impact sur la régulation du cycle cellulaire. En effet, dans une étude de profilage ribosomal à l'échelle du transcriptome dans des cellules HeLa synchronisées dans les diverses phases du cycle cellulaire, il a été trouvé que, à la phase G1, les ARNm avec des séquences 5'-UTR plus courtes étaient associés à un plus grand nombre de ribosomes, et étaient donc davantage traduits. Aussi, tant à la phase G1 comme à la phase S, les ARNm avec un plus grand contenu en guanine et cytosine étaient associés avec un nombre moindre de ribosomes [33].

L'étude de profilage ribosomal a également permis de faire ressortir la nature dynamique de la régulation traductionnelle à travers le cycle cellulaire. En effet, plusieurs ARNm se trouvent différemment associés à des ribosomes à travers le cycle cellulaire. Un autre aspect à faire ressortir de cette étude est la diminution flagrante de ribosomes associés aux ARNm qui est observée durant la mitose en comparaison avec la phase G1 ou S [33]. En contraste avec ce résultat, une autre étude semblable a montré que ~3% des ARNm des cellules HeLa, codant essentiellement des RBPs nucléaires, semblent avoir un profil élevée d'association à des polysomes traductionnellement actifs durant la mitose [34]. La discordance entre ces résultats peut être expliquée par la présence de sites interne d'entrée des ribosomes (Internal Ribosome Entry Site, IRES), soit des séquences trouvées dans certains ARNm qui permettent le recrutement des ribosomes afin d'initier la traduction. Il s'avère que certains des RBPs nucléaires dans l'étude étaient en fait des facteurs trans des IRES (IRES trans-acting factors, ITAFs) reconnaissant les IRES sur les transcrits possédant ces sites, ce qui a pour effet la synthèse des protéines correspondantes. Le recours à ce mécanisme semble pertinent dans le contexte de la mitose où eIF4E (un facteur d'initiation de la traduction) est réprimé. Des IRESs

sont d'ailleurs présents dans certains transcrits encodant des régulateurs mitotiques essentiels [29].

La régulation traductionnelle des ARNm est aussi importante pour les cycles cellulaires durant le développement embryonnaire. Chez la *Drosophile*, par exemple, où les premières divisions cellulaires chez l'embryon se produisent dans un environnement grandement inactif transcriptionnellement, la régulation traductionnelle du pool d'ARNm maternel est essentielle pour dicter les premières étapes du développement, notamment les cycles successifs et rapides entre les phases S et M [31]. La Cycline B joue un rôle crucial pour l'entrée en mitose et sa traduction est sous le contrôle de la kinase PNG. Cette dernière empêcherait en fait la répression traductionnelle de l'ARNm *cycline B* en agissant sur PUM, un membre de la famille des répresseurs traductionnel PUF. Cependant, il reste largement incompris comment l'interaction entre PUM et PNG se fait [29]. De plus, tel que déterminé par une étude à l'échelle du génome, PUM interagit également avec 714 ARNm dans les ovaires (où l'injection du pool d'ARNm maternel se produit) et avec 165 ARNm dans les jeunes embryons, son rôle dans le contrôle méiotique et mitotique reste donc encore à déterminer [35].

Un autre exemple mettant en relief l'importance de la régulation post-transcriptionnelle dans le contrôle du cycle cellulaire concerne le RBP HuR. Il a été observé dans des lymphocytes T synchronisés que cette protéine principalement nucléaire se trouve en faible concentration dans le cytoplasme lors de la phase G1, mais y devient hautement exprimée dans les phases S et G2/M [36]. Cette relocalisation de HuR permettrait à la protéine de stabiliser de manière phase-dépendante divers ARNm cytoplasmiques codant des protéines cruciales pour la régulation du cycle cellulaire. En effet, les transcrits *cycline A2* et *cycline B1* requises pour les

transitions S/G2 et G2/M, respectivement, seraient stabilisés par HuR dans des cellules de carcinome colorectal RKO [37]. HuR stabiliserait également les transcrits *cycline D1* et *cycline E* nécessaires pour la transition G1/S, tel qu'observé dans des cellules du cancer du sein [38, 39]. Par ailleurs, le rôle de HuR ne se limiterait pas à son activité stabilisatrice, mais aurait aussi une fonction inhibitrice sur la traduction d'ARNm codant des inhibiteurs des cyclines [40].

Ainsi, la traduction différentielle d'ARNm apparaît comme un point de contrôle important dans la progression du cycle cellulaire dont la culmination dans la mitose assure l'obtention de deux cellules filles fonctionnelles. À cet égard, cette dernière phase est une étape clé du cycle cellulaire durant laquelle les chromosomes dupliqués sont également distribués dans chaque cellule fille générée [41]. La fidélité de cette ségrégation des chromosomes dépend, entre autres, de l'association des kinétochores au fuseau mitotique dont le fonctionnement et la morphologie sont dictés par une multitude de macromolécules [42]. Le centrosome, par exemple, est une structure primordiale pour assurer la bipolarité du fuseau mitotique [43]. Or, dernièrement, une vaste gamme d'études a montré que plusieurs ARNm sont ciblés au niveau de ces structures mitotiques, laissant entrevoir un rôle fonctionnel tangible pour la localisation des ARNm.

Localisation des ARNm au niveau des microtubules mitotiques

Tel que déjà discuté, il était connu que CPEB est impliqué dans la régulation traductionnelle de certains ARNm en participant dans la polyadénylation de leur région 3'-UTR. Or, dans la *Xénope*, il a été trouvé que cette régulation médiée par CPEB est notamment importante non seulement pour les ARNm maternels lors des premières étapes de

l'embryogénèse, mais également pour la traduction localisée aux microtubules de certains ARNm codant des protéines requises pour la division cellulaire. C'est le cas, par exemple de l'ARNm *cycline B1*, essentiel pour l'entrée en mitose, qui contient un CPE et qui est colocalisé au fuseau mitotique avec CPEB et Maskin dans les jeunes embryons de *Xénope* [44]. Lorsque des anticorps dirigés contre CPEB sont injectés dans ces embryons, la polyadénylation de *cycline B1* est entravée, ce qui résulte en des défauts du fuseau mitotique ainsi qu'en l'inhibition du clivage à la fin de la mitose. De plus, des formes mutantes de CPEB incapables d'interagir avec le fuseau empêchent la traduction localisée aux microtubules de *cycline B1*, résultant également en l'inhibition du clivage à la fin de la mitose [44]. Ces données suggèrent que la traduction localisée au fuseau mitotique de *cycline B1* est importante pour l'exécution adéquate de la division cellulaire.

Chez le *Xénope*, il a été trouvé que la traduction localisée au fuseau médiée par CPEB intervient aussi lors de l'oogenèse pour contrôler la transition de la méiose I vers la méiose II [45]. Des analyses de bio-informatique ont permis de répertorier plusieurs groupes d'ARNm comme cibles potentielles de CPEB en raison des CPE trouvés dans leur séquence. Parmi ces candidats se trouvent des transcrits codant pour des protéines de points de contrôle de la mitose (Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, BubR1), des kinases mitotiques et leurs activateurs (Nek 2B, Aurora A, Aurora B, TPX2) ainsi que des moteurs protéiques associés à la chromatine et/ou aux kinétochores (CENP-E, Xkid) [45]. Des analyses plus précises de l'ARNm *Xkid* ont permis de déterminer que ce transcrit colocalise au fuseau et aux chromosomes avec CPEB dans les oocytes lors de la métaphase I et dans les extraits d'ovocytes arrêtés à la métaphase II. Il a aussi été observé que l'expression de l'ARNm *Xkid*, contenant dans sa région 3'-UTR un CPE permettant son ciblage au fuseau médié par CPEB, permet de rétablir l'alignement approprié

des chromosomes qui se trouve perturbé lorsque *Xkid* est délété. Le rétablissement du phénotype sauvage ne peut cependant se faire dans des expériences de « rescue » avec un construit d'ARNm *Xkid* dépourvu de CPE dans sa région 3'-UTR (soit un transcrite ne pouvant pas être localisé au fuseau). Il a également été observé que l'ajout d'ARNm compétiteurs contenant un CPE déplacent les ARNm possédant un CPE qui se trouvent localisés au fuseau, résultant en une décondensation de la chromatine qui ne peut être rétablie par la surexpression de *Xkid* [45]. Ensemble, ces résultats suggèrent que la traduction localisée au fuseau médiée par CPEB est nécessaire pour l'alignement approprié des chromosomes ainsi que pour la transition adéquate de la méiose I vers la méiose II.

Il a également été trouvé par une étude sur micropuce à l'échelle du génome que ~5% des ARNm dans les ovocytes de *Xénope* arrêtés à la métaphase II se trouvent enrichis dans les microtubules mitotiques. Certains de ces transcrits sont associés à des polyribosomes traductionnellement actifs et les protéines encodées s'intègrent dans le fuseau et participent au bon déroulement de la mitose [46]. Ces résultats supportent l'idée que la traduction localisée au fuseau est essentielle pour l'exécution adéquate de la division cellulaire. De manière intéressante, cette même étude montrait que des ARNm traductionnellement inactifs se trouvaient également localisés au niveau du fuseau, suggérant que certains ARNm aient un rôle non-codant et que leur ciblage aux microtubules serait aussi important pour remplir des fonctions dans la régulation mitotique [46].

Plus récemment, une étude de RNA-seq à l'échelle du génome a permis d'avoir une vue plus complète sur l'ensemble du transcriptome interagissant avec les microtubules d'ovocyte de *Xénope*. Des expériences d'interférence aux ARN (RNA interference, RNAi) sur les transcrits

candidats trouvés a permis d'identifier multiples ARNm ayant un rôle fonctionnel dans la mitose, soit dans l'organisation adéquate du fuseau mitotique ou dans la distribution appropriée de la γ -tubuline [47].

Localisation des ARNm au niveau des centrosomes

Le cycle du centrosome

L'établissement adéquat du fuseau mitotique dépend, entre autres, du centrosome, une organelle primordiale en tant que centre organisateur des microtubules (Microtubule Organizing Center, MTOC). Il est formé de deux centrioles placés perpendiculairement. Ces derniers sont des structures cylindriques entourées par le matériel péricentriolaire (Pericentriolar material, PCM), composé principalement de péricentrines et de complexes γ -TuRC responsables de la nucléation et de la polymérisation des microtubules [43, 48].

Dans une vue canonique de l'assemblage du centrosome, il peut être stipulé que tout comme le génome, le nombre de centrosomes est intimement lié au cycle cellulaire et est soumis à un contrôle numéraire et à un contrôle cycle cellulaire-dépendant. Ainsi, cette structure ne se duplique qu'une seule fois par cycle, en préparation pour la division cellulaire subséquente. À la sortie de la mitose, chaque cellule possède un centriole mère et fille qui se désengagent, perdant ainsi leur conformation orthogonale, mais restant toujours associés par leur attache G1-G2 (G1-G2 tether, GGT). Il s'agit d'un lien plutôt desserré permettant aux centrioles de rester à proximité afin d'assurer que le centrosome accomplisse sa fonction comme MTOC pendant l'interphase [49]. Durant la phase S, chaque centriole verra se former sur le bord de sa paroi un centriole fille auquel il sera attaché par le lien S-M (S-M Linker, SML) participant au maintien

de leur perpendicularité [49]. Une combinaison de régulation SML-dépendante [50, 51] et de quantités limitantes de facteurs requis pour l'assemblage des centrioles [52-54] assure que ces structures-ci ne soient dupliquées qu'une seule fois par cycle. Les deux nouvelles paires de centrioles ainsi formées en phase S accumulent du PCM au cours de la phase G2 pour aboutir aux deux centrosomes matures capables à former le fuseau mitotique durant la mitose [55].

En plus du rôle dans le cycle cellulaire, les centrioles mères peuvent également former les cils et flagelles retrouvés dans certains types cellulaires [56]. De plus, outre la duplication de centrioles nécessitant un centriole préexistant, les cellules peuvent également voir leur nombre de centrioles accroître par formation *de novo* [57, 58].

Le centrosome dans la régulation du cycle cellulaire

En tant que MTOC, le centrosome accomplit plusieurs fonctions microtubule-dépendantes. Cela inclut le maintien de la structure cellulaire, le transport intracellulaire, le positionnement des organelles, l'établissement de la polarité, l'adhésion, la mobilité et notamment l'établissement du fuseau mitotique nécessaire pour assurer le complétion adéquate de la division cellulaire et la ségrégation adéquate des chromosomes [59-61].

Il est toutefois important de noter qu'il a été démontré, chez la *Drosophila* et dans des cellules de mammifère, que la mitose, bien que retardée, peut être menée à terme en l'absence de centrosomes [62, 63]. De manière intéressante, cependant, les cellules de mammifère acentrosomiques ayant complété la division cellulaire sont incapables d'entamer la phase S lors du cycle cellulaire suivant [63]. Supportant ces observations, l'ablation par laser d'un des deux centrosomes dans des cellules mitotiques de mammifère résulte également dans l'arrêt en G1

des cellules ayant complété la mitose et ne possédant pas de centrosome. La cellule ayant hérité du centrosome étant capable de poursuivre dans les prochains cycles cellulaires [64]. Ensemble, ces résultats suggèrent que les fonctions du centrosome ne se limiteraient pas à celle de MTOC, mais qu'il jouerait également un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire.

La perte d'expression de plusieurs composantes du PCM mène également à l'arrêt en G1 [65-69], supportant l'importance de l'intégrité du centrosome pour la complétion du cycle. Une proposition avancée pour expliquer le phénomène est que le centrosome pourrait être une structure à laquelle plusieurs protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire pourraient se fixer. Le centrosome rendrait donc des substrats plus accessibles à leurs enzymes correspondantes, augmentant ainsi l'efficacité des voies de signalisation [55]. Ainsi, la perturbation de la structure du centrosome empêcherait la liaison de certaines protéines, possiblement davantage celles possédant un signal de localisation aux centrosomes (centrosome localization signal, CLS), comme c'est le cas de Cycline E, ou encore Cycline A, qui possède une séquence semblable au CLS [70]. La perturbation du centrosome pourrait aussi enclencher une réponse de stress provoquant l'arrêt en G1 [65, 71].

Il a également été suggéré que le centrosome joue un rôle lors de la transition G2/M. Cela vient du fait que les deux principaux régulateurs de ce point de contrôle, Cdk1 et Cycline B, se localisent au niveau des centrosomes [72-74]. Cette idée est supportée par le corps grandissant d'études montrant la localisation centrosomique de divers régulateurs impliqués dans le point de contrôle G2/M, tels des Cdks, des kinases de point de contrôle (Chks), des kinases Aurora, des kinases Polo-like et des Nek [75-78].

La transition de la métaphase vers l'anaphase semblerait aussi impliquer une certaine régulation par le centrosome. Il a été observé chez la *Drosophila* que la dégradation de Cycline B débute au niveau des centrosomes pour se poursuivre le long du fuseau mitotique, à la suite de quoi l'anaphase est entamée [79]. Et dans des mutants dont les centrosomes se détachent du fuseau durant la mitose, Cycline B est dégradé aux centrosomes, mais non sur le fuseau, résultant en l'arrêt de la cellule en métaphase [80]. La gamma-tubuline [81, 82] semble également être impliquée dans le contrôle de la transition de la métaphase vers l'anaphase en régulant le complexe de promotion de l'anaphase (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome, APC/C), par exemple [83]. CDC27, une composante du APC/C se localise aussi au centrosome et l'injection d'anticorps anti-CDC27 cause un arrêt en métaphase [84].

Les défauts de cytokinèse résultant de l'ablation du centrosome suggèrent également qu'il joue un rôle dans la régulation de cette dernière phase mitotique [62, 64, 85]. Plusieurs observations montrent maintenant que le centrosome se repositionne durant le cycle cellulaire. Ce phénomène serait notamment important pour la cytokinèse. À la cytokinèse, le centriole mère se déplacerait transitoirement vers les microtubules du corps intermédiaire ou « midbody » et déferait les faisceaux de microtubules, produisant le rétrécissement du midbody et la complétion adéquate de la division cellulaire [85]. Il a été proposé que le désengagement des microtubules soit attribuable à la régulation par le centrosome d'un complexe protéolytique, notamment par l'activité du APC/C étant associé au centrosome tout au long du cycle cellulaire [84, 86]. Supportant cette idée, il a été observé que la dérégulation de Cdc14A phosphatase, une composante du centrosome et activateur du APC/C, mène à des défauts de cytokinèse [87]. La perte de fonction de Cdc14A résulterait en des cellules unies par le midbody incapables de se séparer [88].

Ciblage des ARNm aux centrosomes

Lors de la mitose, c'est principalement la duplication des centrosomes qui assure la bipolarité du fuseau mitotique. Il peut ainsi être envisageable qu'un défaut centrosomique ait un impact sur l'architecture des microtubules. À cet égard, plusieurs résultats suggèrent que la localisation d'ARNm ciblé aux centrosomes ait un rôle fonctionnel.

L'idée d'un rôle fonctionnel des ARNm se localisant au niveau de l'appareil mitotique (fuseau et pôles du fuseau) sur la régulation des centrosomes a été introduite par des expériences de traitement à la Cordycepin, un inhibiteur de la polyadénylation, résultant en des défauts centrosomiques dans 87% des embryons de *Xénope* [44].

Plus tard, des expériences de FISH et d'immunofluorescence ont montré que certains ARNm se localisaient de manière asymétrique aux centrosomes lors de la division cellulaire. En effet, il a été observé que, après la duplication des centrosomes, certains ARNm ne sont enrichis qu'à un centrosome en particulier [89]. Il a aussi été déterminé par traitement avec des agents perturbant le cytosquelette que, durant l'interphase, certains ARNm se localisent de manière microtubule-dépendante au PCM. Puis, suivant l'entrée en mitose, ces transcrits se dissocient du PCM pour ne se relocaliser par l'intermédiaire de filaments d'actine qu'au niveau du cortex de la cellule fille se trouvant au pôle animal [89]. L'accumulation de ces ARNm au niveau du centrosome serait par ailleurs nécessaire pour leur localisation corticale subséquente étant donné que ce phénomène est perturbé lorsque l'accumulation des ARNm aux centrosomes est bloquée [89]. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le ciblage centrosomique différentiel des ARNm puisse agir comme mécanisme permettant la division asymétrique menant à la différenciation.

Une autre étude utilisant des méthodes biochimiques et du FISH ont permis de trouver qu'un groupe d'ARNm était enrichi dans les centrosomes extraits d'ovocytes de mactre (surf clam) qui sont arrêtés à la prophase I. Mais il restait encore inconnu si ces ARNm étaient associés aux centrioles ou au PCM [90]. Une étude subséquente montrait qu'un groupe d'ARNm localisés aux centrosomes de mactre étaient codés par des gènes présentant un faible contenu d'introns [91]. Cet observation faisait contraste au contenu intronique plus élevé trouvé dans un groupe d'autres gènes codant des ARNm se localisant au niveau de la machinerie mitotique (Tld, Eve, Dpp, Bub3, Cycline B1) [92]. À cet égard, il a été proposé que la composition différentielle du contenu génétique des divers ARNm définirait la nature fonctionnelle de ces transcrits. Ainsi, certains ARNm seraient ciblés aux centrosomes de manière transitoire, par exemple, alors qu'un autre groupe d'ARNm résiderait plutôt de manière prolongée [91]. Dans cette même étude, il a été observé par FISH que l'ARN 65 associé au centrosome (cnRNA65) possédait un patron de localisation coïncidant avec celui du nucléolinus [91]. Le nucléolinus est un RNP riche en ARN qui est associé au nucléole dans plusieurs types cellulaires [92]. Des analyses avec des sondes ARN complémentaires aux ARN trouvés dans le nucléolinus montrent que ce RNP est associé aux centrosomes et au fuseau [93]. De plus, l'induction de dommage au nucléolinus faite par microchirurgie au laser dans les ovocytes de mactre, résulte en l'échec de la formation des centrosomes et du fuseau méiotique après fécondation [93]. Bien que le rôle du nucléolinus reste à déterminer, les résultats suggèrent que ce RNP est important pour l'organisation adéquate des structures mitotiques.

Une étude d'immunoprécipitation couplée à de la spectrométrie de masse a permis d'identifier 251 protéines associés aux centrosomes de *Drosophile* dont beaucoup d'entre elles étaient des RBPs. Parmi les protéines identifiées, la déplétion par interférence aux ARN de 11

gènes dans les cellules embryonnaires de *Drosophila* SL2, résultait en la désintégration du centrosome [94]. Cette étude a également permis d'identifier 24 protéines ayant un rôle fonctionnel associé aux centrosomes, dont 13 orthologues ont été identifiés dans les cellules HaCaT humaines, confirmant ainsi leur conservation chez l'humain [94].

Plusieurs autres études couplant des méthodes d'immunoprécipitation, de la spectrométrie de masse, du séquençage à haut débit, des analyses computationnelles ainsi que l'interférence aux ARN ont permis d'identifier une collection de RBPs et d'ARNm impliqués dans la régulation de la mitose [33, 95-99]. Ce corps grandissant de données concernant la localisation des ARNm au niveau des microtubules et centrosomes laisse ainsi entrevoir ces structures mitotiques comme des RNPs et renforce l'idée d'un rôle fonctionnel pour la localisation des ARNm dans la régulation mitotique.

Aberrations centrosomiques et maladies humaines

En tant que MTOC, le centrosome remplit un rôle important en établissant le fuseau mitotique bipolaire lors de la mitose, nécessaire pour assurer la ségrégation appropriée des chromosomes. Une dérégulation centrosomique pourrait ainsi résulter en l'établissement aberrant du fuseau conduisant à l'aneuploïdie, soit une des caractéristiques principales du cancer [100, 101]. Tel que discuté précédemment, complémentirement à son rôle de MTOC, plusieurs études suggèrent que le centrosome soit aussi impliqué dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. À cet égard, il peut également être postulé que des anomalies au niveau des centrosomes puissent entraver certaines voies de signalisation impliquant le centrosome, menant

à l'établissement de la tumorigenèse. Il a d'ailleurs été démontré chez la *Drosophile* que l'amplification anormale de centrosomes peut mener au développement de tumeurs [102].

Le centrosome est aussi requis pour la ciliogenèse. Ainsi, un dysfonctionnement des centrosomes peut avoir une répercussion sur la formation des cils et pourrait résulter dans le développement de ciliopathies auxquelles sont associées des maladies et malformations tels la polydactylie, des anomalies cranio-faciales, malformation cérébrales, situs inversus, diabète, obésité, la maladie polykystique des reins, ou la dégénérescence rétinienne [103-106].

La *Drosophile* comme modèle pour étudier la mitose

Chez la *Drosophile*, le développement embryonnaire commence avec le blastoderme syncytial durant lequel 13 divisions nucléaires synchrones se produisent dans un cytoplasme commun, soit le syncytium (**fig. 3**). Les huit premiers cycles sont complétés en 8 minutes chacun et se produisent au centre de l'embryon. À la neuvième division, les noyaux migrent en périphérie et 5 noyaux sont spécifiquement relocalisés au pôle postérieur de l'embryon. Ces derniers seront cellularisés et donneront naissance aux gamètes chez la mouche adulte. Au dixième cycle, la majorité des noyaux se trouvent en périphérie où leurs divisions se font plus lentement lors des cycles subséquents. Durant ces 13 divisions, le cycle cellulaire est écourté à seulement la phase S (duplication de l'ADN) et à la mitose [107, 108]. De plus, la transcription zygotique étant généralement inhibée lors de ces stades développementaux, l'ensemble du processus dépend du matériel génétique maternel déposé dans l'embryon [31]. Le 14^e cycle marque la transition mid-blastulienne (Midblastula Transition, MBT) où la synthèse de l'ARN zygotique devient importante et où la membrane plasmique embryonnaire s'invagine autour des noyaux corticaux, entraînant la cellularisation des noyaux. Ceci mène à la formation d'un

feuillet épithélial qui abritera l'ensemble des progéniteurs somatiques de l'organisme [109, 110]. Les divisions suivantes deviennent asynchrones et requièrent plus de temps [111].

Avec son grand nombre de fuseaux mitotiques se divisant de manière synchrone, l'embryon syncytial de *Drosophila* est un système modèle qui constitue un outil de travail puissant pour étudier la mitose. N'ayant que quatre chromosomes, les manipulations génétiques sont également plus accessibles. La mouche à fruit résulte aussi un modèle attrayant par le fait que plus de la moitié de ses gènes possèdent des homologues chez l'humain [112]. De ce fait, une multitude d'études effectuées sur la *Drosophila* ont permis de mieux comprendre la régulation du cycle cellulaire, notamment au niveau de plusieurs points de contrôle [113-115], de la régulation de plusieurs cyclines [79, 116], de l'implication du centrosome dans la progression du cycle [62, 63, 85, 117, 118] et de son implication dans la tumorigenèse [102].

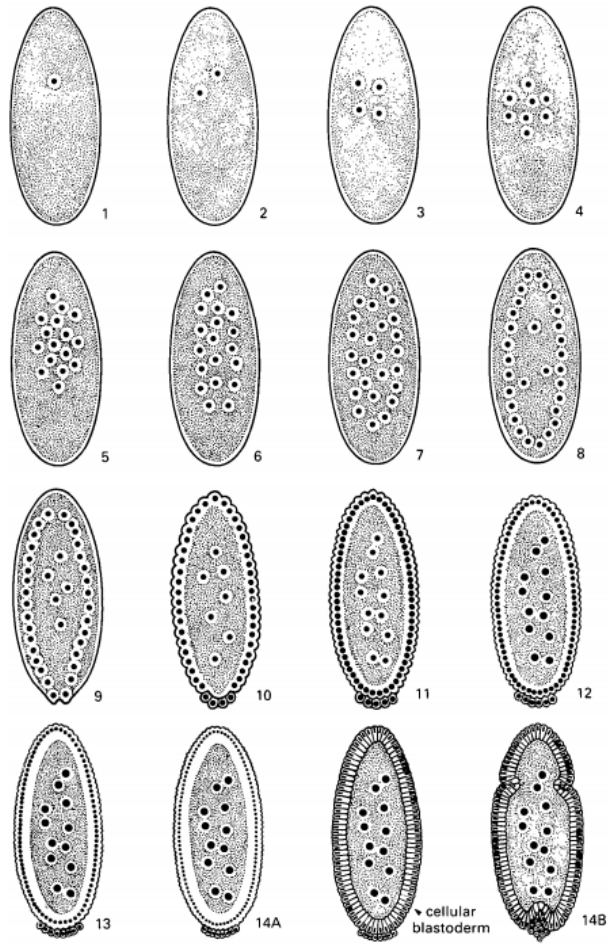


Figure 3. Schématisation des premiers stades d'embryogenèse chez la *Drosophile*. La traduction du matériel génétique maternel assure la complétion des 13 premières divisions qui se produisent de manière synchrone dans un cytoplasme commun appelé syncytium. Les divisions 1 à 8 se font au centre de l'embryon, à la suite de quoi les noyaux migrent en périphérie (cycles 9-10) où ils continueront à se diviser lors des cycles subséquents (cycles 11-13). La 14^e division est asynchrone et marque la MBT, caractérisée par la cellularisation des noyaux et l'expression du génome zygotique. Image prise de Foe et Alberts. 1983. *J Cell Sci* [108].

Problématique, hypothèse et objectifs

La localisation intracellulaire des ARNm, combinée à leur traduction localisée, représente un mécanisme exquis pour moduler la distribution subcellulaire des protéines. Une étude de FISH a démontré que >70% des ~3000 ARNm étudiées dans les embryons de *Drosophila* sont localisés dans des patrons qui corréleront fortement avec la distribution et la fonction des protéines encodées [23]. Parmi les catégories d'ARNm identifiés, une quarantaine d'ARNm démontrent un ciblage au niveau de l'appareillage mitotique (**fig. 4**), suggérant que la traduction localisée des ARNm puisse jouer un nouveau rôle dans le contrôle de la division cellulaire [1]. De plus, la localisation des ARNm au niveau des centrosomes [90] et des microtubules [47] rapportée dans des études laissent voir le centrosome et le fuseau mitotique comme des complexes ribonucléoprotéiques. Cependant, bien que plusieurs de ces ARNm encodent des protéines requises pour l'assemblage et la fonction des centrosomes et des microtubules, l'importance du ciblage de ces transcrits reste à déterminer. Le ciblage des ARNm étant assuré par les RBPs, des éléments *Trans*-régulateurs qui reconnaissent les éléments *Cis* sur les ARNm [24], **mon hypothèse est que la localisation des ARNm aux centrosomes est fonctionnellement importante pour la mitose et qu'elle est contrôlée par des facteurs *Trans*-régulateurs évolutivement conservés.**

Pour tester mon hypothèse, mon travail de mémoire avait pour but : **1)** de caractériser des facteurs RBP fonctionnellement impliqués dans la localisation des ARN mitotiques chez la *Drosophila*, et **2)** d'évaluer la conservation de la fonction de ces facteurs dans les cellules humaines.

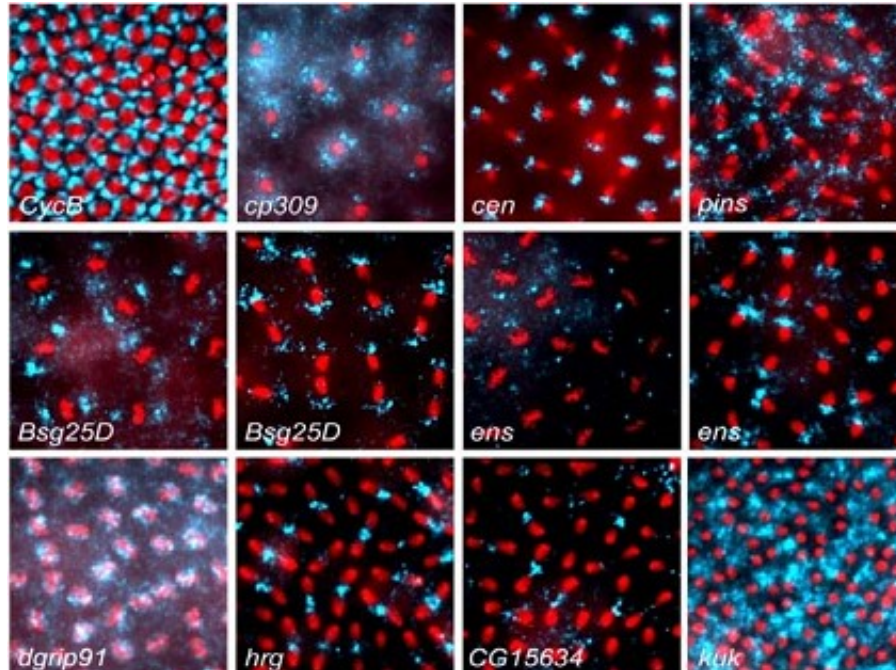


Figure 4. ARNm localisés au niveau de l'appareil mitotique chez la *Drosophila melanogaster*. Analyse de FISH sur les embryons au stade syncytial marqués avec des sondes ARN s'hybridant aux ARNm indiqués (bleu) et coloré avec du DAPI pour l'ADN (rouge). Les transcrits montrent des ciblage à différentes structures de l'appareil mitotique : centrosomes et microtubules astraux (*CycB*, *CP309*, *Cen*, *Bsg25D*, *Ens*), à proximité des chromosomes lors de la métaphase (*dgrip91*) et au fuseau mitotique (*Hrg*, *CG15634*, *Kuk*). Image prise de Lécuyer et al. 2007. *Cell* [23].

Afin d'explorer comment la mitose est régulée par les ARNm, mon projet sera centré sur l'étude du rôle et du mécanisme de localisation des ARNm sur la machinerie mitotique. Le projet fera suite aux travaux déjà entamés par la Dre Julie Bergalet qui, à partir de compilations trouvées dans la littérature, a établi une liste de RBPs possiblement impliqués dans la localisation d'ARNm au niveau de l'appareil mitotique (**tableau I**). Les RBPs ont été retenus selon trois critères de sélection : **1)** RBPs ayant été identifiés comme étant enrichis dans des centrosomes de *Drosophile* dans des approches de protéomique, **2)** RBPs pour lesquels la perte de fonction médiée par RNAi mène à des défauts mitotiques dans les cellules de *Drosophile* S2

et, 3) RBPs pour lesquels il a été prédit un motif de liaison aux ARN se localisant à l'appareil mitotique.

Tableau I. Liste de RBPs possiblement impliqués dans la localisation d'ARNm au niveau de l'appareil mitotique

Drosophila gene	Human ortholog	Functions
egl	EXD1	transport RNA
me31B	DDX6	DDX6 DEAD box helicase
Ataxin 2	ATXN2	localization, locomotory behavior
Zn72D	ZFR	RNA splicing
CG30122	HNRNPUL1	hnRNPU/splicing
l(3)72Ab	snrNP200	RNA splicing
Tudor-SN	SND1	RNA induced silencing complex
clu	CLUH	translational initiation; intracellular distribution of mitochondria; mitochondrion localization.
CG9425	HELZ2	Ataxin-2, C-terminal, nucleotide binding, nucleoside-triphosphatase activity
Fibrillarin	FBL	mRNA binding, tRNA processing; RNA processing; rRNA processing; centrosome organization
lost/growl	MTHFSD	pole plasm mRNA localization; mRNA splicing, via spliceosome; pole plasm oskar mRNA localization
cup	---	RNA binding, regulation of translation
bol	DAZ2	mRNA binding; regulation of translation
caprin	---	RNA binding, not known
larp	LARP1	RNA-binding protein Lupus La, centrosome separation
CG7033	CCT2	RNA helicase
crn	CRNK11	RNA-processing protein, HAT helix
Rae1	Rae1	RNA export, localization
Ge-1	edc4	cytoplasmic mRNA processing body assembly; pole plasm oskar mRNA localization
msi	msl1	translation repressor
BicC	Bicc1	translation
Fmr1	FXR1, FXR2	transport, traduction
pUf68	pUf60	mRNA binding; poly(U) RNA binding, mRNA splicing, via spliceosome; regulation of cell cycle
Cnot4	Cnot4	mRNA binding, negative regulation of transcription, RNA degradation, centrosome organization
heph	PTBP1	mRNA 3'-UTR binding; negative regulation of <i>oskar</i> mRNA translation, mRNA splicing
modulo	---	mRNA binding
sc35	srfs2	regulation of alternative mRNA splicing
rnp4f	SART3	RNA processing
rox8	TIA1	regulation of alternative mRNA splicing
Bruno 2	CELF1	mRNA alternative splicing
Bruno 3	CELF4	mRNA alternative splicing

rin	G3BP1	transport; mRNA splicing
pumilio	pum1, pum2	Pumilio RNA-binding repeat, translational regulation
B52	SRSF5, SRSF4, SRSF6	Mrna splicing, mitosis
ref2	ALYREF	mRNA export from nucleus
mask	ANKHD1	RNA binding, Ankyrin repeat
Imp	IGF2BP3	IGF2BP/transport RNA
Hsp83	Hsp90AB1	hsap/HSP90/chaperone
Jafrac1	PRDX2	peroxiredoxin/metabolism
Top3beta	TOP3B	Topoisomerase 3
TFAM	TFAM	transcription factor mitochondrial
Hsc70-4	HSPA	chaperone
mtSSB	SSBP1	SSBP1 mitochondrial single stranded DNA binding protein
CG10077	DDX5	DDX5 DEAD box helicase
Top2	Top2A	Topoisomerase 2
Patr-1	---	Topoisomerase II-associated protein PAT1, cytoplasmic mRNA processing body assembly
Not1	CNOT1,	CCR4-Not complex component
l(2)NC136/ CNOT3	CNOT3	CCR4-NOT complex
Nup153	---	Nuclear pore complex protein, Zinc finger, RanBP2-type
SF2	SRSF1	splicing
a2bp1	RBFOX1	tissue-specific alternative splicing
Tis11	ZFP36	mRNA degradation
aret	CELF2, CELF1	alternative splicing, mRNA editing, translation
papi	TDRKH	piRNA biogenesis
fne	ELAVL2, ELAVL4	mRNA stabilization
Rbp9	ELAVL4	mRNA stabilization
TBPH	TARDBP	alternative splicing of CFTR gene, transcriptional repressor
qkr54B	KHDRBS3	alternative splicing
qkr58E-1	KHDRBS3	alternative splicing
qkr58E-2	KHDRBS3	alternative splicing
Sxl	---	RNA splicing

Matériel et Méthodes

Préparation de la sonde d'ARN

Une librairie de gènes de *Drosophile* de la collection 1 (DGC1) gardés sous forme d'ADN complémentaire (ADNc) bactérien dans un stock de glycérol dans des plaques de 96 puits a été utilisée. Ces bactéries ont été mises en culture, puis utilisées pour amplifier l'ADNc de Cen et Histone H3 par PCR en utilisant des amorces universelles s'hybridant aux séquences des promoteurs bactériophagiques T7 et Sp6 flanquant les ADNc. Les produits PCR ont été déposés sur gel afin de vérifier la taille et la qualité des fragments d'intérêt, puis ils ont été extraits du gel avec un kit d'extraction de gel d'agarose BioBasic Inc. Les ADNc ont ensuite été purifiés par précipitation à l'éthanol et resuspendus dans de l'eau sans ARNase.

Les sondes anti-sens marquées avec la digoxigénine (DIG) ont été synthétisées par transcription in vitro à 37°C pendant 4h. Les transcrits obtenus ont été purifiés par précipitation à l'éthanol et resuspendus dans de l'eau sans ARNase, puis déposés sur gel afin d'évaluer la qualité et la taille des sondes.

Collecte d'embryons

Les stocks de *Drosophile* utilisés pour ces travaux proviennent de Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC). Les divers croisements de *Drosophile* se sont faits en maintenant les mouches dans des cages à 25°C, avec 50% d'humidité. Les cages étaient placées sur des boîtes de pétri d'agar de jus de pomme contenant de la nourriture (levure) et où les mouches pouvaient pondre leurs embryons. Le matin les boîtes de pétri étaient remplacées par une nouvelle boîte

de pétri, dans laquelle les embryons étaient collectés après trois heures, puis lavés avec une solution 1:1 Javel:eau afin de les déchorioner.

Fixation des embryons au méthanol et immunofluorescence

Après leur déchoriation, les embryons ont été rincés à l'eau et mis dans un tube contenant de l'heptane et secoués légèrement à la main pendant 1 minute. Du méthanol a été ajouté pour avoir une solution biphasique 1:1 méthanol:heptane, et les tubes ont été secoués pendant 1 minute supplémentaire. Les embryons ont été prélevés dans le méthanol, lavés 3 autres fois avec du méthanol et gardés dans le dernier lavage à -20°C.

Lorsqu'utilisés pour l'expérience d'immunofluorescence, les embryons ont été rincés 1 fois dans du méthanol, 1 fois dans un mélange 1:1 méthanol:PBT (PBS 1X + 0,5% Triton X-100) et 2 fois dans du PBT. Ils ont ensuite été perméabilisés pendant 15 minutes dans du PBT, sous agitation. L'étape de blocage s'est faite dans du PBTB (PBT + 3% BSA) pendant 15 minutes, sous agitation. Des incubations de 1h avec les anticorps primaires et secondaires monoclonaux se sont faites séparément à température ambiante, sous agitation. Anticorps primaires à 1/50 d'AbD Serotec: anti- α -tubuline de rat (MCA78G); anti- γ -tubuline de lapin (Q617). Anticorps secondaires à 1/100: anti-rat Cy5 de chèvre (A10525-Invitrogen); anti-lapin Alexa Fluor 488 de chèvre (111-545-003- Jackson Immuno Research Laboratories). Les embryons ont été lavés 1 fois dans du PBTB, PBT et PBS 1X, PBS 1X - DAPI 1X et 2 fois dans du PBS 1X, puis conservés dans du DABCO (2,5% DABCO; 70% glycérol; PBS 1X) à 4°C.

Fixation des embryons au paraformaldéhyde et FISH

Après leur déchoriation, les embryons ont été rincés à l'eau et mis dans une solution 1:3 heptane:PBS 1X + paraformaldéhyde 3,7%, sous agitation pendant 20 min. En prenant soin de ne pas prendre la phase aqueuse (PBS), les embryons ont été transférés dans du méthanol pour avoir une solution biphasique 1:1 méthanol:heptane. Les tubes ont été secoués vigoureusement par inversion, puis les embryons ont été lavés au méthanol 3 autres fois et gardés dans le dernier lavage à -20°C.

Lorsqu'utilisés pour l'expérience d'hybridation *in situ* à fluorescence, les embryons ont été rincés 1 fois dans du méthanol, 1 fois dans un mélange 1:1 méthanol:PBT (PBS 1X + 0,1% Tween-20) et 2 fois dans du PBT. Une deuxième fixation a été faite dans du PBT + paraformaldéhyde 3,7%, sous agitation pendant 20 min, suivie de 3 lavages dans du PBT. Les embryons ont ensuite été mis dans une solution de protéinase K 3µg/mL pour une première incubation à température ambiante pendant 10 min, sans agitation, puis pour une deuxième incubation sur glace pendant 1h. Les embryons ont été lavés 2 fois avec une solution de glycine à 2mg/mL, puis rincés 2 fois avec du PBT. Les embryons ont alors été fixés une troisième fois dans du PBT + paraformaldéhyde 3,7%, sous agitation pendant 20 min, puis lavés 5 fois dans du PBT et rincés avec une solution 1:1 PBT:solution d'hybridation (50% formamide; SSC 5X; 0,1% Tween-20; 100µg/mL d'ADN de spermatozoïdes de saumon; 100µg/mL d'héparine; eau sans ARNase). Les embryons ont été transférés dans une plaque de 96 puits et incubés à 56°C pendant 2h dans la solution de préhybridation (solution d'hybridation bouillie 5 min et mise sur glace 5 min). Les embryons ont ensuite été incubés sur la nuit à 56°C dans la solution d'hybridation contenant la sonde marquée avec DIG (~100ng de sonde dans la solution

d'hybridation chauffée à 80°C pendant 3 min, puis mise sur glace pendant 5 min). Les embryons ont été rincés avec la solution d'hybridation, puis lavés 1 fois dans chacune des solutions suivantes à 56°C pendant 15 min : solution d'hybridation; 3:1 solution d'hybridation:PBT; 1:1 solution d'hybridation:PBT; 1:3 solution d'hybridation: PBT. 4 lavages à 56°C pendant 5 min ont ensuite été faits dans du PBT. Ces incubations ont été suivies par des étapes d'amplification de signal au tyramide (Tyramide signal amplification, TSA), à température ambiante : blocage dans du PBTB (PBT + 1% lait) pendant 10 min, incubation avec l'anticorps monoclonal anti-DIG biotinylé (200-062-156-Jackson Immuno Research Laboratories) dilué à 1/400 pendant 1.5h et incubation avec le complexe streptavidine-HRP (Molecular Probes) dilué à 1/100 pendant 1h. Les embryons ont ensuite été lavés 1 fois avec du PBTB:DAPI 1X, puis 5 fois avec du PBTB, 1 fois dans du PBT et 3 fois dans du PBS. Finalement, les embryons ont été incubés avec de la tyramide couplé à Cy3 dilué à 1/50, à température ambiante pendant 1.5h, puis lavés 6 fois pendant 5 min avec du PBS et conservés dans du DABCO à 4°C.

Extraction d'ARN pour qPCR

Après leur déchoriation, les embryons ont été rincés à l'eau et homogénéisés dans 500µL de TRIzol. Après l'ajout de 500µL de chloroforme, les échantillons ont été mélangés vigoureusement par inversion, puis laissés au repos pendant 3 min. Par la suite, ils ont été centrifugés à 12 000 rpm et à 4°C pendant 15 min. La phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée et mise dans un volume égal d'isopropanol. Les échantillons ont alors été mélangés par inversion et laissés au repos pendant 10 min, puis centrifugés à 12 000 rpm et pendant 10 min à

4°C. Le culot d'ARN a été lavé avec de l'éthanol 70%, puis séché à l'air et finalement resuspendu dans de l'eau sans ARNase.

Les ARN totaux extraits ont été utilisés pour faire des réactions de reverse transcription (RT) et obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). La RT a été réalisée à partir de ~1 ng d'ARN avec 2.5 µM d'oligos dT, 2.5 µM d'amorces hexamères aléatoires, 0,5 mM de chaque dNTP et de l'eau sans ARNase incubés à 65°C pendant 5 min, puis mis sur glace pendant 1 min. À ce mélange ont été ajoutés 10 mM de DTT, 40 U d'RNaseOUT et le tampon 5X First Strand de la compagnie Invitrogen, le tout incubé à 37°C/2 min, suivi de l'ajout de 200 U de la reverse transcriptase M_MLV (Invitrogen) et d'incubations à 25°C/10 min, 37°C/50 min et 70°C/15 min. Les ADNc obtenus ont ensuite été utilisés pour faire des qPCR en utilisant des amorces de ~20 nucléotides spécifiques pour chaque gène d'intérêt. Le design des amorces s'est fait de manière à ce qu'elles s'hybrident aux jonctions exon-exons des ADNc et donnent un produit PCR entre 190 et 195 paires de bases. Les amorces ont été considérées comme donnant un seul amplicon à partir des pics uniques observés dans les « melting curves ». Les qPCR ont été réalisées avec du SYBR Green et le programme suivant : 50°C/2 min, 95°C/10 min, (95°C/15 sec, 60°C/1 min) x 40 cycles, 95°C/15 sec, 60°C/1 min, 95°C/15 sec. Les qPCR ont été faites en triplicata.

Test de viabilité des embryons

Les embryons ayant été pondus durant la nuit ont été collectés et alignés sur une boîte de pétri placée dans une chambre humide à 25°C et 50% d'humidité. Les embryons ayant éclos en larve ont ensuite été comptés 1, 2 et 3 jours post-ponaison.

Culture cellulaire et synchronisation des cellules

Les cellules HeLa ont été cultivées dans le milieu DMEM (de la compagnie Wisent) complétement avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% Pénicilline/Streptomycine. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% CO₂.

Les cellules HeLa ont été synchronisées par double blocage de thymidine. La première incubation avec de la thymidine 2 mM a été faite sur 18 heures, suivie d'un lavage (relâche des cellules) de 8 heures. La deuxième incubation avec de la thymidine 2 mM s'est faite sur 16 heures et a été suivie d'un lavage de 10 heures. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde 3,7%.

Immunofluorescence dans les cellules

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (3904 de Corning Costar) où elles ont été synchronisées par double blocage de thymidine. Après synchronisation, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 3,7% pendant 20 minutes, lavées 3 fois avec du PBS 1X, perméabilisées avec du PBT (PBS 1X + 1% Triton X-100) pendant 5 minutes et lavées 2 fois avec du PBS. Ensuite les cellules ont été bloquées pendant au moins une heure dans du PBTB (PBS 1X + 0,5% Triton X-100 + 3% BSA) à température ambiante. Des incubations de 1 heure avec les anticorps primaires et secondaires se sont ensuite faites séparément à température ambiante. Anticorps primaires : 1/1000 anti- α -tubuline de rat (MCA78G, AbD Serotec), 1/1000 anti- γ -tubuline de souris (GTU-88, Sigma Aldrich) et anti-RBP de lapin (de la compagnie Bethyl [119]) dont la concentration était spécifique à chaque anticorps. Anticorps secondaires : 1/200 anti-rat-488 de chèvre (Jackson ImmunoResearch),

1/200 anti-souris-488 de chèvre (Jackson ImmunoResearch) et 1/500 anti-lapin-Cy5 d'âne (Life Technologies). Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBT, 1 fois dans du PBT-DAPI 1X et 3 fois dans du PBS 1X, puis gardées dans le dernier lavage à 4°C.

Acquisition et traitement d'images

Les échantillons ont été analysés avec un microscope d'épifluorescence Leica DMRB équipé d'un plateau rotatif, d'une caméra digitale DCX-950P 3CCD de Sony et du logiciel Volocity pour visionner les images. Les embryons ont aussi été analysés avec un microscope confocal Zeiss LSM 700 équipé d'un plateau rotatif, d'une caméra digitale AxioCam et du logiciel ZEN pour visionner les images. Pour les images de FISH, la tyramide Cy3 et le Dapi ont été re-colorés à l'ordi en vert et en rouge, respectivement, afin d'obtenir un meilleur contraste. Les figures ont été élaborées avec Photoshop.

Les cellules HeLa ont été analysées avec un microscope de criblage à haut débit ImageXpress Micro de Mecerlar Devices, muni d'un objectif 40X et d'une caméra TI-DH de Nikon. Les images ont été analysées avec le logiciel MetaXpress.

Résultats

Identification de RBPs impliqués dans le ciblage de l'ARNm *cen* au centrosome

Profil de localisation de l'ARNm cen

La localisation au niveau du centrosome de la protéine Centrocortin (Cen) [120] et de son transcrit correspondant [23] ayant été reportée dans les jeunes embryons de *Drosophile*, il a premièrement été question d'observer la dynamique d'expression de l'ARNm *cen*. À cette fin, des analyses de FISH avec une sonde ARN couplée à la digoxigénine (DIG) et complémentaire au transcrit *cen* ont été réalisées sur des embryons de *Drosophila melanogaster* OreR (phénotype sauvage) au stade de blastoderme syncytial. Les résultats montrent que, durant l'interphase, la localisation de *cen* est bien précise à chaque centrosome (**fig. 5**). À la suite de la duplication des centrosomes, lors du début de la mitose (prophase), *cen* se localise généralement à chaque centrosome. Dans certains cas, le transcrit est asymétriquement localisé sur un seul centrosome (**fig. 5**), ce qui concorde avec le patron de localisation de la protéine Cen [120]. En opposition à Cen, cependant, qui se localise à un seul centrosome, en métaphase, l'ARNm *cen* se trouve aux deux centrosomes (**fig. 5**). Lors de la télophase, le signal de *cen* au niveau des deux centrosomes devient plus dispersé (**fig. 5**). Dans l'ensemble, *cen* semble se localiser aux centrosomes tout au long du cycle cellulaire dans les jeunes embryons de *Drosophila melanogaster*.

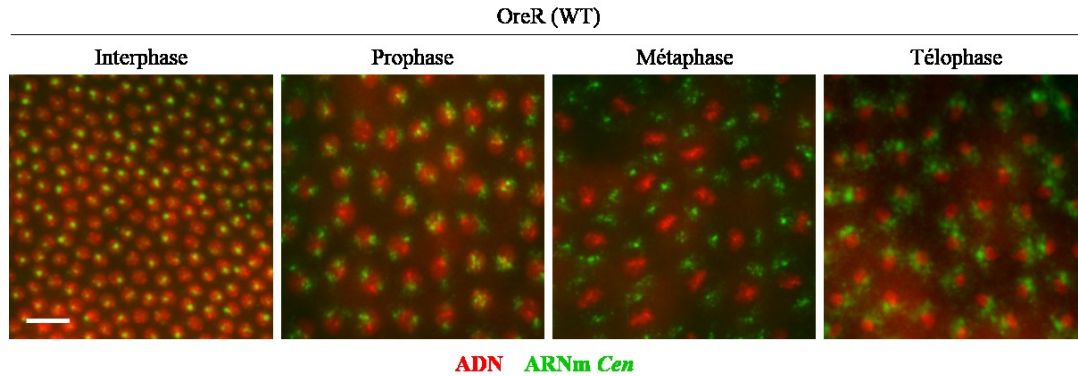


Figure 5. L'ARNm centrosomique *cen* est présent durant tout le cycle cellulaire dans les jeunes embryons de *Drosophila melanogaster*. Analyse de FISH par microscopie d'épifluorescence d'embryons OreR (phénotype sauvage, WT) au stade de blastoderme syncytial pour différentes phases du cycle cellulaire. L'ADN a été coloré avec du DAPI. L'ARNm *Cen* a été visualisé par hybridation d'une sonde ARN complémentaire couplée avec DIG. La barre d'échelle représente 15µm.

RNAi dans les embryons de Drosophile

Dans le but d'identifier des RBPs qui seraient impliqués dans la localisation d'ARN mitotiques, des expériences de knock-down *in vivo* par RNAi dirigé contre les transcrits des RBPs ont été réalisées dans la *Drosophila melanogaster*. Les 29 RBPs ciblés correspondent aux RBPs provenant du tableau I et pour lesquels des mutants étaient disponibles au laboratoire. Il s'agit de RBPs que la Dre Bergalet, ayant débuté le projet, a préalablement sélectionnés dans la littérature selon trois critères : 1) RBPs ayant été identifiés comme étant enrichis dans des centrosomes de *Drosophile* dans des approches de protéomique, 2) RBPs pour lesquels la perte de fonction médiée par RNAi mène à des défauts mitotiques dans les cellules de *Drosophile* S2 et 3) RBPs pour lesquels il a été prédit un motif de liaison aux ARNs se localisant à l'appareil mitotique.

Le RNAi s'est fait en utilisant le système UAS-Gal4 permettant d'induire par Gal4 des mouches transgéniques surexprimant des ARN en épingle à cheveux (hairpin RNA; hpRNA) complémentaires à l'ARNm ciblé. Les hpRNA sont clivés en petits ARN interférents (small interfering RNA; siRNA) par la machinerie endogène de RNAi ainsi que par la protéine Dicer-2 inductible par Gal4 inséré dans le but d'augmenter l'efficacité du knock-down (**fig. 6**).

Dans les jeunes embryons de *Drosophila* (stade de blastoderme syncytial) la transcription est inactive et les processus développementaux dépendent des transcrits maternels y ayant été déposés lors de l'oogenèse dans les ovaires [31, 121]. Tel est le cas des ARNm maternels comme *cen* et ceux des RBPs d'intérêt. Ainsi, afin d'assurer la déplétion des transcrits de RBPs au moment et au tissu où leur fonction est requise, l'inducteur Nanos-Gal4-VP16 utilisé a rendu possible le ciblage spécifique du RNAi aux cellules germinales de l'ovaire (**fig. 6**). Il est donc attendu que les embryons pondus soient dépourvus des transcrits maternels des RBPs ciblés.

Les embryons issus des femelles surexprimant Dicer-2 et les hpRNA ont été récoltés au stade de blastoderme syncytial, phase durant laquelle les ARN maternels ne sont pas encore dégradés. Des expériences subséquentes d'immunofluorescence (IF) et de FISH ont, respectivement, permis d'évaluer les effets sur les structures mitotiques et sur la localisation de l'ARNm centrosomique *cen* (**fig. 6**). Les embryons analysés correspondaient plus précisément aux cycles mitotiques 10 à 13, durant lesquels les noyaux se trouvent en périphérie de l'embryon.

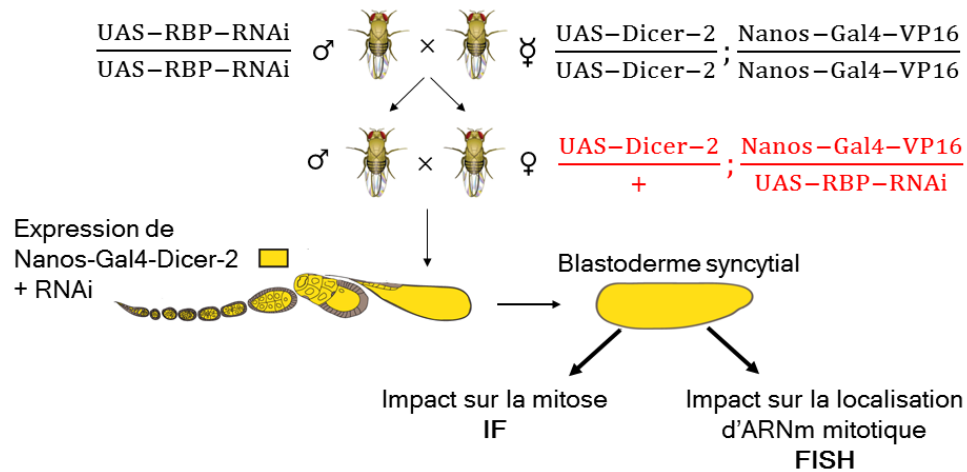


Figure 6. RNAi dans les embryons de *Drosophila melanogaster*. Schéma montrant les croisements effectués pour obtenir des lignées de femelles transgéniques surexprimant Dicer et des hpRNAs générant un knock-down *in vivo* des transcrits maternels des 29 RBPs spécifiques ciblés par RNAi. Les embryons au stade de blastoderme syncytial ont été récoltés sur un laps de trois heures après leur pondaison.

Expression des RBPs soumis au RNAi dans les embryons mutants

Afin d'évaluer la perte d'expression des RBPs ciblés par RNAi dans les mouches transgéniques, une tentative de quantification de l'ARNm des RBPs a été réalisée par RT-qPCR à partir de l'ARN total extrait des embryons mutants au stade de blastoderme syncytial. En plus du contrôle OreR comme phénotype sauvage (WT), le mutant contrôle UAS-Dicer-2 a également été utilisé. Ce dernier correspond au génotype surexprimant seulement Dicer-2 et il était attendu à ce qu'il montre une expression de RBPs très semblable au WT OreR. Néanmoins, les résultats suggèrent que l'expression des RBPs ciblés est diminuée dans plusieurs mutants UAS-Dicer-2 et que plusieurs RBPs sont plus exprimés dans les transgènes RBP-RNAi en comparaison au contrôle UAS-Dicer-2 (**fig. 7**). Les données ont été analysées par quantification relative ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Pour cette méthode, il est normalement considéré qu'un écart-type < 0.25 reflète

une qualité valide des échantillons (ici faits en triplicata). Pour les échantillons analysés, cependant, leurs écart-type correspondants sont supérieurs à 0.25, se traduisant par des valeurs de quantification relative moins fiables (valeurs non montrées). Par des contraintes de temps, cette qPCR n'a été effectuée qu'une seule fois sur 11 des 29 RBPs-RNAi mutants générés. Ainsi, la qPCR doit être refaite et des étapes d'optimisation sont nécessaires afin de pouvoir conclure sur la quantification du niveau d'expression des RBPs.

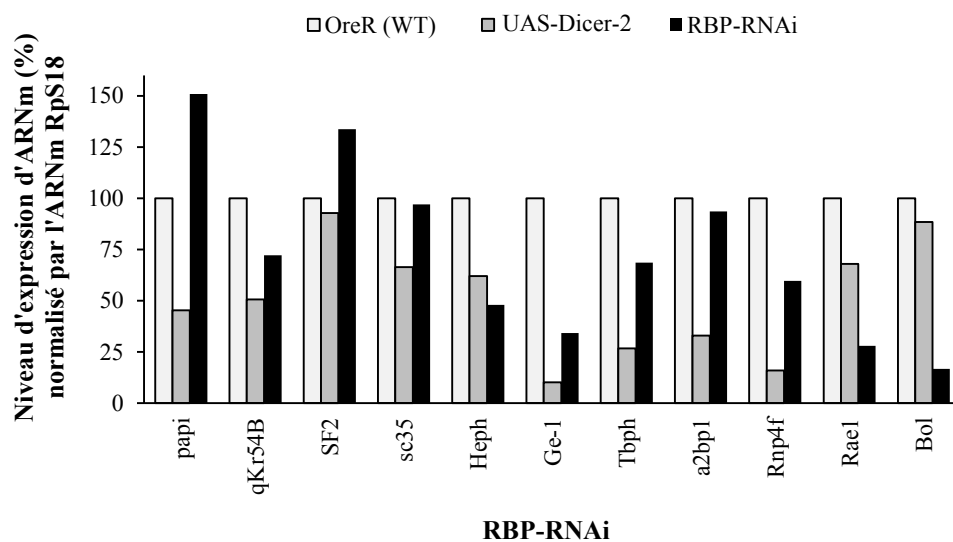


Figure 7. Quantification par RT-qPCR de l'expression des RBPs soumis au RNAi dans les embryons mutants de *Drosophila melanogaster*. L'ARNm total a été extrait des embryons collectés sur un laps de trois heures après leur pondaison, et soumis à une réaction de RT en utilisant des amorces oligo dT. Les amorces conçues pour la qPCR s'hybrident aux jonctions exon-exon et donnent des amplicons de 190-195pb quantifiés avec du SYBR Green. OreR est le génotype sauvage (WT), UAS-Dicer-2 est le génotype contrôle surexprimant Dicer-2 et RBP-RNAi est le génotype surexprimant Dicer-2 et le hpRNA dirigé contre l'ARNm du RBP ciblé. Les analyses par qPCR ont été effectuées seulement sur les 11 échantillons de mutants knock-down illustrés dans la figure-ci. La qPCR a été effectuée une seule fois en triplicata. Des optimisations sont nécessaires pour procéder à l'analyse des autres mutants.

Viabilité des mutants RBP-RNAi

Dans son cycle de développement, l'embryon de *Drosophile* éclot en larve ~1 jour suivant sa fécondation. Dans le but d'évaluer l'effet de la perte d'expression des RBPs ciblés par RNAi, la viabilité embryonnaire des mouches mutantes a été analysée en comptant le nombre d'embryons qui se développaient en larves 1 jour post-ponaison (PP) (**fig. 8**). Les embryons non comptés mouraient sans se développer en larve. De plus, il a aussi été intéressant d'évaluer si la perte d'expression des RBPs ciblés aurait un impact sur la durée du développement. À cette fin, le compte d'embryons a également été réalisé 2 et 3 jours PP. Des 29 mutants étudiés, 5 (Pum, Fib, CG7033, Rbp9, aret) ne pondent pas d'embryons (**fig. 8**). Il a aussi été observé que, 1 jour PP, le pourcentage d'embryons étant devenus larves pour le mutant Rae1 a diminué à 70%, pour Mask, à 66%, pour Heph et Bol, à 32%, pour rin, à 55%, et pour a2bp1, à 51% (**fig. 8**). De ces 6 RBPs, seulement a2bp1 montre une différence significative dans la viabilité entre 1 (51%) et 3 jours (67%) PP (**fig. 8**). Ainsi, la perte d'expression de ces 16 RBPs semble diminuer la viabilité des embryons de *Drosophile* et a2bp1 semble également retarder le développement de l'embryon mutant.

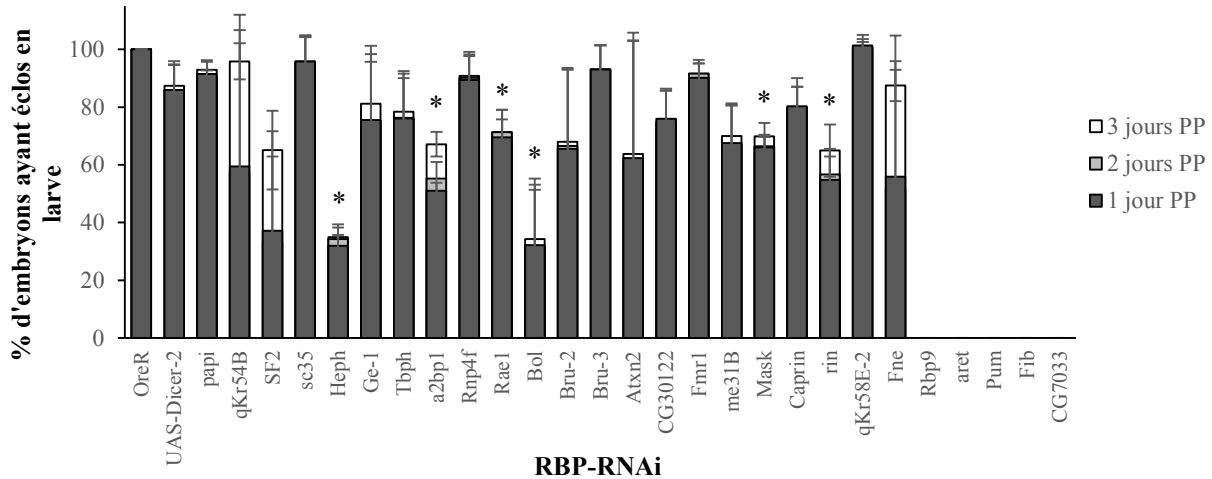


Figure 8. Viabilité embryonnaire selon le RBP soumis au RNAi dans les mutants de *Drosophila melanogaster*. Le compte s’est fait avec 50 embryons et a été répété 3 fois. Les RBPs-RNAi montrant un pourcentage nul correspondent aux mutants qui ne pondent pas d’embryons. UAS-Dicer-2 est le génotype contrôle surexprimant Dicer-2. PP : post-ponaison. La signification statistique pour les résultats 1 jour PP a été évaluée par un test t non apparié avec un intervalle de confiance de 95% en utilisant GraphPad Prism; Rae1 : $p = 0.0122$, Mask : $p = 0.0037$, Heph : $p = 0.0009$, Bol : $p = 0.0305$, rin : $p = 0.0174$, a2bp1 : $p = 0.0010$. Pour a2bp1, le pourcentage d’embryons ayant éclos en larves est significativement différent entre 1 jour et 3 jours PP, $p = 0.0067$.

Localisation de cen et phénotypes mitotiques dans les embryons RBP-RNAi

Afin d’évaluer davantage l’effet de la déplétion des RBPs dans les mouches transgéniques, des analyses de FISH et d’IF ont été réalisées dans les jeunes embryons mutants de *Drosophile* (blastoderme syncytial). Les fuseaux mitotiques étant le mieux visibles à la métaphase, les embryons dont le cycle cellulaire était en métaphase ont été considérés pour l’analyse des phénotypes mitotiques. Le FISH a été fait avec une sonde ARN couplée à DIG et complémentaire à l’ARNm centrosomique *cen*, dont la localisation aux centrosomes en métaphase a été constatée dans les embryons OreR WT (**fig. 5**). Les analyses du FISH ont été faites de manière qualitative en regardant 5 à 10 embryons pour chaque RBP-RNAi sur

l'ensemble de l'échantillon. Deux types de défauts dans la localisation de *cen* ont principalement été observés : marquage diffus accompagné d'un signal dispersé (Bru-2 et CG30122) et un signal plus faible (sc35 et Mask) en comparaison au WT OreR. De plus, la déplétion de ces RBPs ne semble pas avoir de répercussions sur la localisation d'ARNm telle *Histone H3* (**fig. 9, tableau II**), dont un exemple est montré pour CG30122 (tous les autres 23 mutants RBPs-RNAi présentent le même signal). Ensemble, ces résultats ouvrent la possibilité pour suggérer que ces 4 RBPs soient impliqués, de manière distincte, dans la régulation de l'ARNm *cen*.

Dans le but d'observer l'effet de la perte d'expression des RBPs cibles par RNAi *in vivo* sur la structure mitotique, des analyses d'IF ont été faites avec des anticorps anti- α -tubuline et anti- γ -tubuline pour marquer le fuseau mitotique et les centrosomes, respectivement. Les analyses d'IF ont été faites de manière qualitative en observant 5 à 10 embryons dans l'ensemble de l'échantillon. Les défauts repérés sont des fuseaux monopolaires (Bru-2, Ge-1 et SF2), de la γ -tubuline libre (Bru-3 et Ge-1) et des fuseaux plus petits (Mask) (**fig. 10, tableau II**), suggérant que ces 5 RBPs jouent des rôles différents dans la régulation de la division cellulaire.

Le RNAi induit *in vivo* dans les embryons de *Drosophila* semble résulter en des défauts mitotiques et/ou en la localisation anormale de l'ARNm *cen* pour 9 RBPs-RNAi. Parmi ceux-ci, seulement Mask montre une diminution de leur viabilité embryonnaire (**fig. 8, tableau II**). Les autres 5 RBPs-RNAi montrant une viabilité réduite, et pour lesquels des IF et FISH ont été réalisés, ne semblent pas montrer de défauts mitotiques et de localisation de l'ARNm *cen* (données non montrées). Mask-RNAi étant le seul à montrer les trois phénotypes (viabilité réduite, localisation de *cen* anormale et défaut mitotique), il constitue un candidat RBP intéressant ayant possiblement un rôle dans la mitose via la régulation de *cen*.

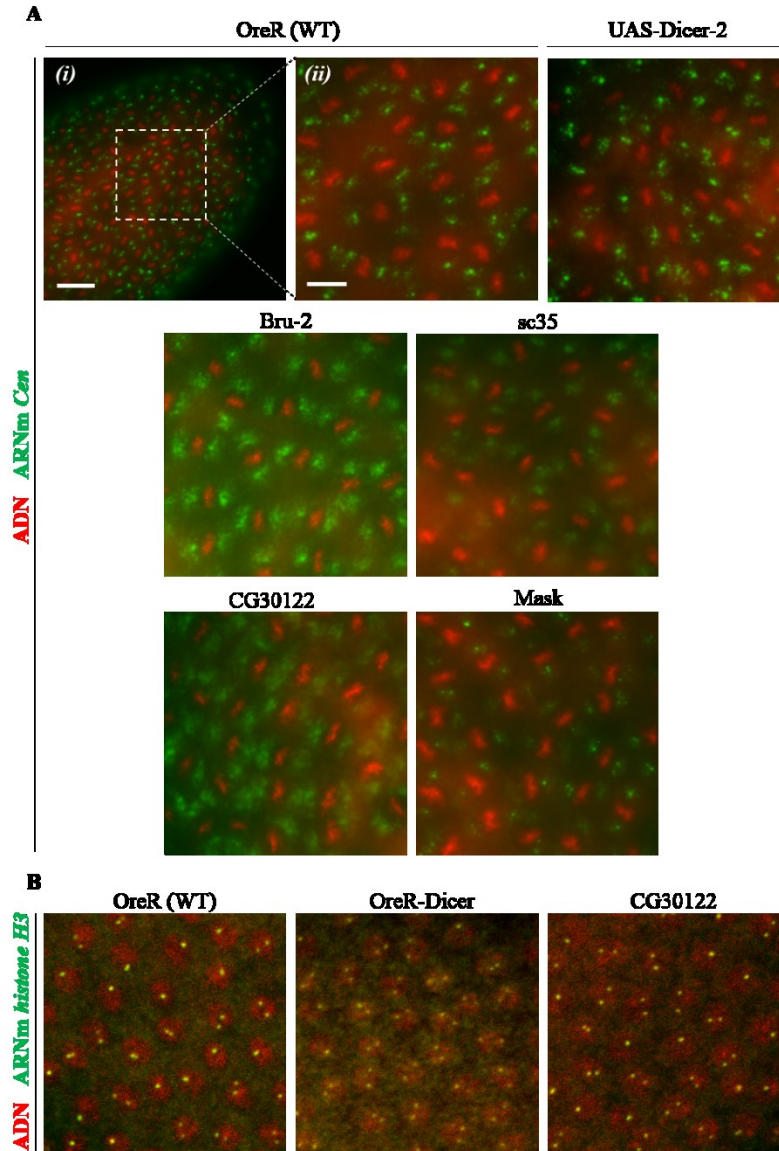


Figure 9. Localisation de l'ARNm *Cen* durant la métaphase analysée par FISH dans les jeunes embryons de *Drosophila melanogaster* dont les RBPs sont soumis au RNAi. A. Effet sur la localisation de l'ARNm *Cen*. En (i) est illustré un embryon OreR (phénotype sauvage, WT) dont les noyaux sont en métaphase; la barre d'échelle représente 50 μ m. (ii) correspond à une vue rapprochée de (i); la barre d'échelle représente 15 μ m. UAS-Dicer-2 est le génotype contrôle surexprimant Dicer-2. Les RBPs-RNAi ci-désignés sont ceux ayant montré un phénotype décrit dans le tableau II. B. Effet sur la localisation de l'ARNm *Histone H3*. En A et en B : il s'agit de blastoderme syncytiaux dont l'ADN a été coloré avec du DAPI et les ARN ont été visualisés par hybridation d'une sonde ARN complémentaire couplée avec DIG. Les résultats proviennent d'observations qualitatives faites sur 5 à 10 embryons dans l'ensemble de l'échantillon.

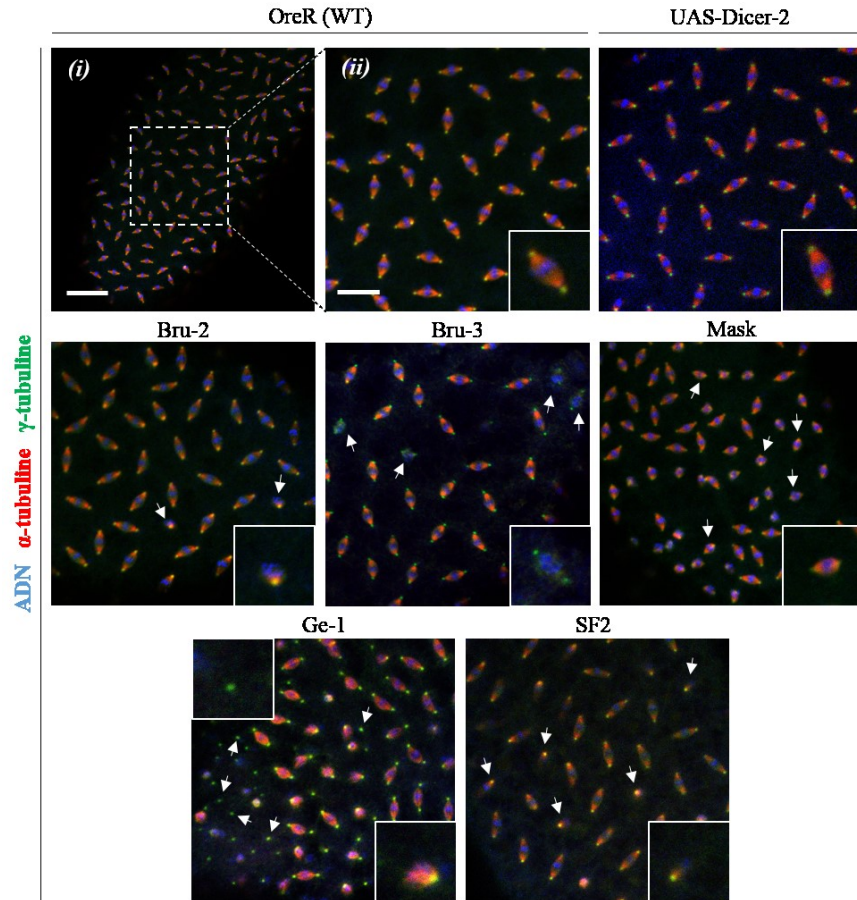


Figure 10. Effets mitotiques analysés par IF dans les jeunes embryons mutants de *Drosophila melanogaster* dont les RBPs sont soumis au RNAi. En (i) est illustré un embryon OreR (phénotype sauvage, WT) dont les noyaux sont en métaphase; la barre d'échelle représente 50 μm . (ii) correspond à une vue rapprochée de (i); la barre d'échelle représente 10 μm . UAS-Dicer-2 est le génotype contrôle surexprimant Dicer-2. Les RBPs-RNAi ci-désignés sont ceux ayant montré un phénotype décrit dans le tableau II. Les embryons sont des blastoderms syncytiaux dont l'ADN a été coloré avec du DAPI et le fuseau mitotique et les centrosomes, visualisés avec des anticorps anti- α -tubuline et anti- γ -tubuline, respectivement. Les flèches blanches indiquent les centrosomes libres, les fuseaux monopolaires et les fuseaux plus petits. Les images correspondent à des sections optiques uniques prises avec un microscope confocal. Les résultats proviennent d'observations qualitatives faites sur 5 à 10 embryons dans l'ensemble de l'échantillon.

Évaluation du profil de localisation de RBPs par criblage IF

Avec l'idée globale d'évaluer si la possible fonction des RBPs dans la localisation des ARN mitotiques est conservée chez l'humain, le premier pas a été d'observer si les orthologues humains des RBPs cibles se localisent à des structures mitotiques (fuseau mitotique et centrosomes) dans les cellules HeLa. Nonobstant, ayant accès à une banque d'anticorps dirigés contre 182 RBPs [119], il a été opté de passer au travers de tous ces RBPs au moyen d'un criblage IF afin d'identifier d'autres RBPs ayant un possible rôle dans la régulation mitotique. Ainsi, des cellules HeLa ont été synchronisées par double blocage à la thymidine afin d'augmenter le nombre de cellules en métaphase dans lesquelles le fuseau mitotique peut être mieux apprécié. L'IF s'est fait avec des anticorps anti- α -tubuline et anti- γ -tubuline comme marqueurs du fuseau mitotique et des centrosomes, respectivement. En tenant compte du nombre d'anticorps primaires utilisés et les fluorochromes disponibles au laboratoire, ainsi que pour éviter le chevauchement de signaux qui peut subvenir lorsque des fluorochromes possèdent des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission rapprochées, les α - et γ -tubuline ont été toutes les deux visualisées avec le même fluorochrome.

Les cellules ont été observées un microscope de haut débit et les images générées, analysées avec le logiciel MetaXpress en suivant la méthodologie illustrée à la figure 11. L'analyse par masques a permis d'établir des ratios entre l'intensité de signal du RBP qui colocalise avec le fuseau mitotique et/ou le centrosome et l'intensité du RBP dans le reste de la cellule (**fig. 11A**). La logique derrière cette méthode est que, si un RBP colocalise préférentiellement avec la structure mitotique, le signal y étant associé devrait être supérieur au signal dans les autres compartiments de la cellule. Ainsi, à partir des ratios obtenus pour des

RBPs qui ne colocalisent pas avec les structure mitotiques, tels AKAP8 et MAK16 (**fig. 11B, 12**), une colocalisation positive a été considéré pour un ratio ≥ 1.3 .

Pour compléter l'analyse par masques, la méthode Linescan a également été employée. En traçant une ligne sur le plan d'intérêt, l'intensité des signaux des RBPs et des α - et γ -tubuline ont été suivi sur la distance dictée par le trait dessiné (**fig. 11B**). CDC40 représente un exemple positif de colocalisation et AKAP8 et MAK16 représentent un exemple négatif de colocalisation (**fig. 11B**).

L'analyse des 182 RBPs est reportée à la figure 12. Il est possible de voir que, pour la grande majorité des RBPs, la localisation au fuseau mitotique et au centrosome a été considérée ambiguë, notamment parce que le signal du RBP était homogène dans l'ensemble de la cellule. Ainsi, la localisation ambiguë fait davantage référence à la localisation non préférentielle du RBP à la structure mitotique. Parmi ces RBPs, cependant, 7 ont été considérés comme se localisant au niveau du fuseau mitotique et possiblement au centrosome : HNRNPUL1, AKAP1, RBMX2, WDR43, NUSAP1, CDC40 et RPS3 (**fig. 13**). CCDC86 semble se localiser seulement aux centrosomes en métaphase (**fig. 13**). Tous les RBPs criblés semblent avoir des profils de localisation différents aux divers stades du cycle cellulaire (**fig. 12, fig. suppl. 1**).

Parmi les RBPs soumis au RNAi dans la *Drosophile*, 4 possédaient des orthologues humains disponibles dans la banque d'anticorps (**tableau II**). Parmi ceux-là, seulement l'orthologue de CG30122 (HNRNPUL1), dont la déplétion résulte en la localisation aberrante de l'ARNm *cen*, a été considéré comme ayant une colocalisation positive avec le fuseau mitotique et les centrosomes (**fig. 12,13, tableau II**), introduisant l'idée qu'il soit impliqué dans la régulation de CDR2 (orthologue humain de Cen) chez l'humain.

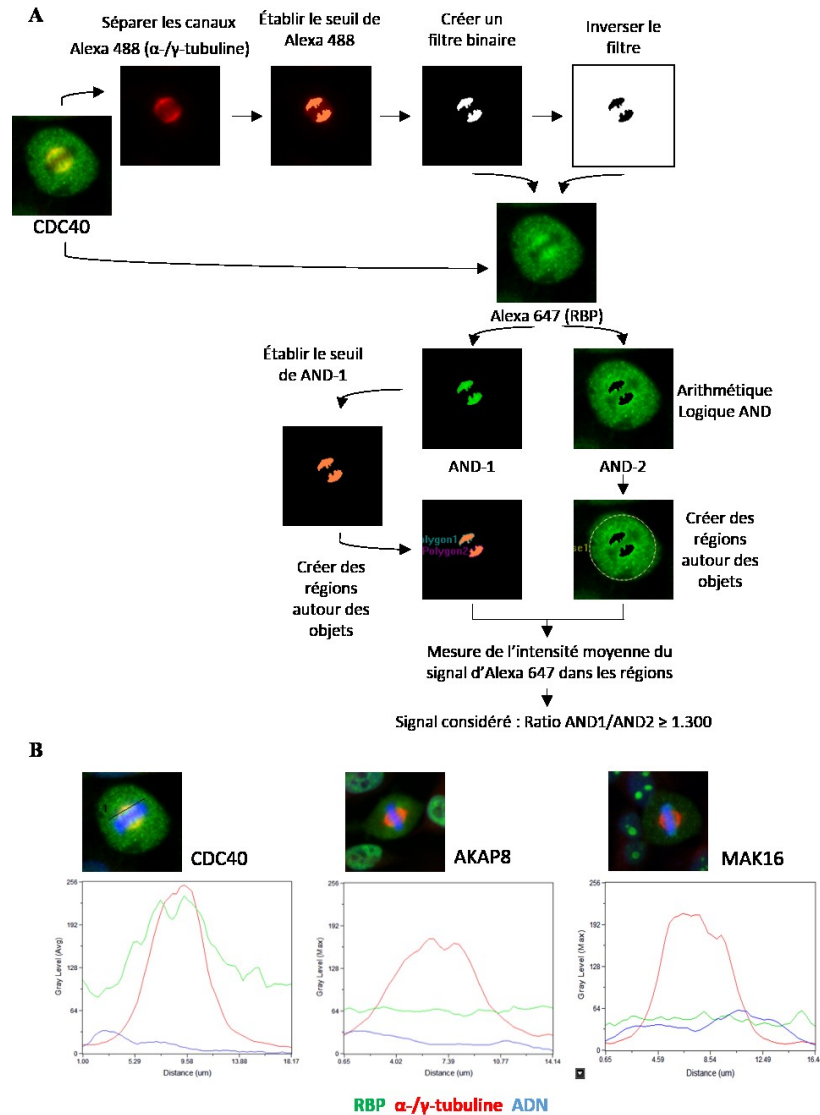
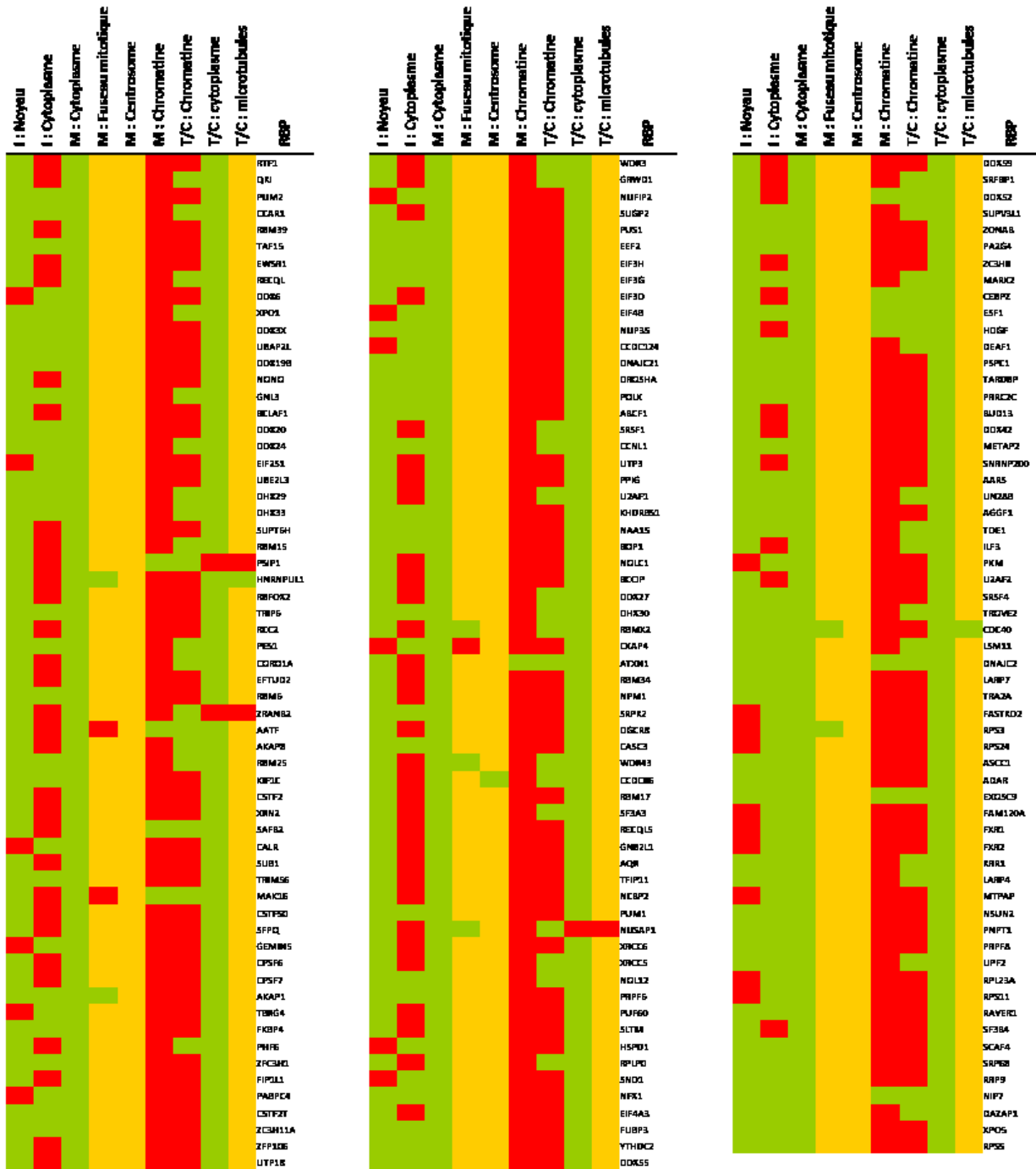


Figure 11. Méthodologie pour l'analyse du crible IF sur les cellule HeLa. Les cellules HeLa ont été synchronisées par double blocage de thymidine. La localisation des 182 RBPs au niveau du fuseau mitotique et/ou des centrosomes a été évaluée avec le logiciel de traitement d'images MetaXpress en quantifiant l'intensité de colocalisation par masques (A) et en évaluant comment le signal du RBP suit celui des marqueurs du fuseau mitotique (α -tubuline) et des centrosomes (γ -tubuline) (B). A. À l'aide de masques, un ratio a été établi entre l'intensité de signal du RBP colocalisant avec le fuseau mitotique/centrosome et l'intensité du RBP dans le reste de la cellule. Le ratio accepté pour considérer une colocalisation positive est ≥ 1.3 . B. Méthode Linescan pour le suivi des signaux sur la distance à l'aide d'un vecteur dessiné sur la cellule. CCDC40 correspond à un profil de colocalisation positive. AKAP8 dont le signal est uniforme dans l'ensemble de la cellule et MAK16 qui est davantage ciblé à la chromatine correspondent à des profils de non-colocalisation.



Colocalise avec la structure
 Ne colocalise pas avec la structure
 Colocalisation ambiguë

Figure 12. Profil de localisation des 182 RBPs analysée par criblage IF dans des cellules HeLa. En suivant la méthode d'analyse illustrée à la figure 11, l'analyse de la localisation des RBPs au fuseau mitotique et/ou aux centrosomes a fait ressortir 8 candidats présentés à la figure

13. Le profil de localisation des RBPs a également été suivi sur le cycle cellulaire de manière qualitative; I : Interphase, M : Métaphase et T/C : Télophase/Cytocinèse. Des anticorps anti-RBP ont été utilisés conjointement à des anticorps anti- α -tubuline (marqueur du fuseau mitotique) et anti- γ -tubuline (marqueur du centrosome) marqués avec le même anticorps secondaire. La localisation ambiguë fait référence à un RBP qui se localise de manière uniforme dans l'ensemble de la cellule. Les cellules HeLa ont été synchronisées avec un double blocage de thymidine.

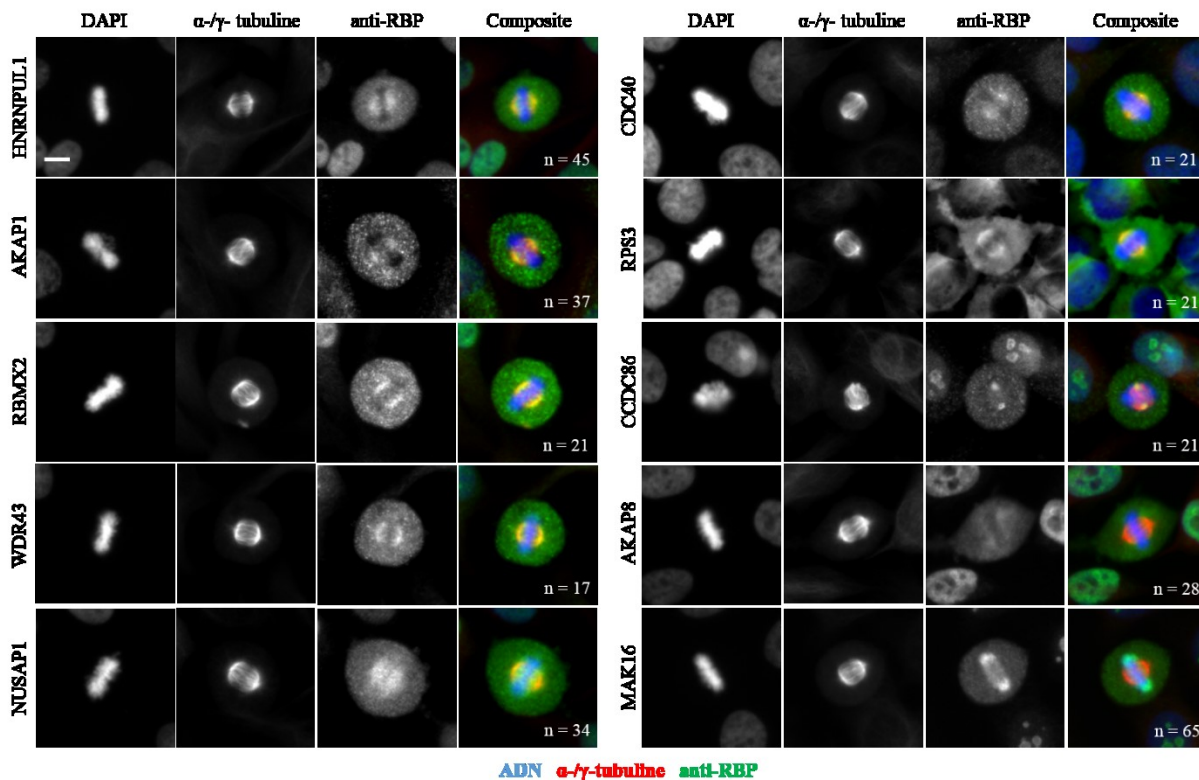


Figure 13. RBPs montrant une localisation au niveau du fuseau mitotique et/ou du centrosome dans les cellules HeLa en métaphase. Les cellules HeLa ont été synchronisées avec un double blocage de thymidine. Les critères d'analyse présentés à la figure 11 ont été suivis. Des anticorps anti-RBP ont été utilisés conjointement à des anticorps anti- α -tubuline (marqueur du fuseau mitotique) et anti- γ -tubuline (marqueur du centrosome) marqués avec le même anticorps secondaire. Le nombre « n » correspond au nombre de cellules en métaphase qui ont été analysées. La barre d'échelle représente 10 μ m.

Tableau II. Compilation des phénotypes observés dans les embryons mutants de *Drosophila melanogaster* dans lesquels les RBPs sont soumis au RNAi

RBP-RNAi	V _E ^a	Défaut de localisation de l'ARN <i>Cen</i> ^b	Défaut mitotique ^c	Orthologue ^d	Candidat ^e
OreR (WT)	-	-	-	-	-
UAS-Dicer-2 ^f	-	-	-	-	-
papi	-	-	-	-	-
qKr54B	-	-	-	-	-
SF2	-	-	Fuseaux monopolaires	SRSF1	-
sc35	-	Signal plus faible	-	-	-
Heph	Diminuée	-	-	-	-
Ge-1	-	-	Fuseaux monopolaires / γ -tubuline libre	-	-
Tbph	-	-	-	-	-
a2bp1	Diminuée	-	-	-	-
Rnp4f	-	-	-	-	-
Rae1	Diminuée	-	-	-	-
Bol	Diminuée	-	-	-	-
Bru-2	-	Marquage diffus / signal dispersé	Fuseaux monopolaires	-	-
Bru-3	-	-	Noyaux sans fuseau, mais avec γ -tubuline	-	-
Atxn2	-	-	-	-	-
CG30122	-	Marquage diffus / signal dispersé	-	HNRNPUL1	Oui
Fmr1	-	-	-	FXR1/2	-
me31B	-	-	-	DDX6	-
Mask	Diminuée	Signal plus faible	Fuseaux plus petits	-	-
Caprin	-	-	-	-	-
Rin	Diminuée	-	-	-	-
qKr58E-2	-	-	-	-	-
fne	-	-	-	-	-

^a V_E : viabilité embryonnaire (fig. 8). ^b Les aberrations ont été évalués par FISH avec un sonde ARN complémentaire couplée à DIG dans les jeunes embryons (blastoderme syncytial) de *Drosophila melanogaster* (fig. 9). ^c Les défauts ont été évalués par IF avec des anticorps dirigés contre α - et γ -tubuline (fig. 10). ^d RBP de *Drosophila* pour lequel son orthologue humain a été testé au criblage IF (fig. 12). ^e RBP Humain ressortant comme candidat positif pour la localisation au fuseau mitotique dans le criblage IF (fig. 13). ^f UAS-Dicer-2 correspond au génotype contrôle surexprimant Dicer-2.

Discussion

Les deux objectifs du projet étaient de caractériser des facteurs RBPs fonctionnellement impliqués dans la localisation des ARN mitotiques dans la *Drosophile*, et d'évaluer la conservation de la fonction de ces facteurs dans les cellules humaines. Les RBPs considérés pour cette étude proviennent d'une liste préalablement établie selon des critères précis (**tableau I**). Les RBPs y ont été compilés à partir de données de la littérature pour des RBPs enrichis aux centrosomes de *Drosophile* dans des approches protéomiques, des RBPs dont la perte de fonction par RNAi résulte en des défauts mitotiques dans les cellules S2 de *Drosophile*, et des RBPs pour lesquels il a été prédit un motif de liaison aux ARN se localisant à l'appareil mitotique.

Régulation de l'ARNm *cen* et effet sur la mitose

Pour le premier objectif, l'ARNm de CEN (Centrocartin) a été considéré. Ce gène encode la protéine Cen, reconnue pour participer avec la Centrosomin dans l'assemblage du sillon de clivage dans les embryons de *Drosophile* [120]. De plus, Cen a été observé au centrosome et il a été proposé que son transcrite *cen* se localise aux centrosomes [23, 120]. Dans l'optique d'utiliser la localisation de *cen* comme paramètre pour évaluer les possibles rôles des RBPs ciblés dans la localisation d'ARN centrosomique et par extrapolation possiblement dans la régulation de la mitose, il a été d'intérêt investiguer davantage le profil de localisation de l'ARNm *cen* au travers du cycle cellulaire dans les jeunes embryons de *Drosophile*. Ainsi, les embryons de *Drosophile* au stade de blastoderme syncytial analysés par FISH ont permis d'observer que *cen* se trouve aux centrosomes avec des patrons de localisation différents selon

la phase du cycle cellulaire (**fig. 5**). Les résultats obtenus supportent les données de Kao et al. sur la localisation de la protéine Cen dans la *Drosophila melanogaster* [120]. En effet, *cen* semble également se localiser de manière ponctuelle aux centrosomes durant l'interphase, puis soit à un centrosome ou aux deux lors de leur duplication, à la prophase. Lors de la télophase, le signal se trouve plus dispersé, mais semble toujours localisé aux centrosomes (**fig. 5**). De manière intéressante et contrairement à la localisation de Cen, en métaphase, le transcrit *cen* semble se localiser non seulement à un des centrosomes, mais aux deux (**fig. 5**), laissant entrevoir la possibilité que *cen* ait un certain rôle régulateur à la métaphase. Ensemble, ces observations proposent que la traduction de *cen* puisse être régulée aux centrosomes. À cet effet, il serait intéressant de réaliser un FISH/IF afin d'analyser si Cen colocalise avec son transcrit. Par ailleurs, la présence de Cen au centrosome durant l'interphase suggère une fonction non mitotique de la protéine en plus de sa fonction précédemment identifiée dans l'assemblage du sillon de clivage lors de la cytokinèse [120]. Au début de la mitose, la duplication des centrioles engendre un centrosome mère et fille biochimiquement différents [122]. En conséquence, la localisation asymétrique de *cen* à un seul centrosome plutôt qu'au deux montrerait en fait un ciblage régulé durant la mitose. Il serait ainsi possible que *cen* lie préférentiellement le centrosome mère ou fille, par exemple. Un complément pertinent à cette expérience serait d'effectuer des FISH/IF avec une sonde pour *cen* et des anticorps contre Pericentrin et CP110, soit des marqueurs du PCM [123] et des centrioles [124], respectivement, afin de confirmer la localisation exacte de *cen*.

Afin de caractériser des RBPs impliqués dans la localisation des ARN mitotiques, des expériences de déplétion médiées par RNAi ont été faites *in vivo* dans les embryons de *Drosophila melanogaster* (**fig. 6**). Les RBPs ciblés pour le knock-down correspondent aux RBPs

listés dans le tableau I et pour lesquels des mutants étaient disponibles au laboratoire. Les mouches transgéniques ont été générées de manière à ce qu'elles surexpriment des hpRNA ciblant les ARNm des RBPs d'intérêt ainsi que Dicer-2, reporté pour augmenter l'efficacité du RNAi [125]. Par contre, comme il a aussi été reporté que l'utilisation de Dicer-2 peut avoir un effet délétère [126], un contrôle surexprimant seulement Dicer-2 (UAS-Dicer-2) et non les hpRNA a également été généré afin d'évaluer l'effet de Dicer-2 pour lequel on s'attend à des résultats semblables au WT OreR.

En essayant de quantifier l'efficacité de la perte d'expression des RBPs ciblés, une RT-qPCR a été réalisée sur l'ARN total extrait des embryons de *Drosophila* au stade de blastoderme syncytial. Dû à des contraintes de temps, l'expression de seulement 14 RBPs a été analysée par qPCR (**fig. 7**). La majorité des RBPs semblent être moins exprimés dans les mutants RNAi en comparaison au WT, et contrairement à ce qui était attendu, les transgènes UAS-Dicer-2 semblent exprimer moins de RBPs que les mutants RBP-RNAi dans plusieurs cas (**fig. 7**). Une possible explication pour les résultats de UAS-Dicer-2 serait que l'ARN ait été dégradé dans les étapes d'extraction. Il serait ainsi important de vérifier son intégrité en regardant sur gel le ratio des ARN 28S/18S qui devrait être supérieur à 2 [127].

Quant à l'expression globale des RBPs dans les trois génotypes WT, UAS-Dicer-2 et RBP-RNAi, l'expérience pourrait être complétée d'un contrôle fait avec des échantillons d'ARN n'ayant pas été convertis en ADNc par RT. En effet, bien que les amorces aient été construites de manière à ce qu'elles reconnaissent les jonctions exon-exon trouvées seulement dans l'ARNm, il reste probable que les extraits d'ARN contiennent du matériel génomique contaminant, contribuant à augmenter la quantité de RBP détectée dans la qPCR. Le SYBR

Green liant préférentiellement l'ADN double brin, la détection d'un signal indiquerait ainsi la présence d'ADN dans le contrôle avec de l'ARN. De plus, bien que les pics uniques observés dans les courbes de dénaturation (melting curves non montrées) indiquent l'amplification d'un seul produit, il serait tout de même pertinent de déposer les produits de la qPCR sur gel afin de s'assurer de la spécificité des amorces.

En raison de l'expression supérieure au WT observée pour les mutants *papi-RNAi* et *fne-RNAi* (**fig. 7**), il est également à considérer que la quantité de RBP détectée puisse avoir été influencée par l'hétérogénéité populationnelle d'embryons récoltés. En effet, certains embryons peuvent ne pas avoir été pondus tout de suite après leur fécondation qui se produit à l'intérieur de la mouche avec les spermatozoïdes gardés dans le réceptacle séminal de la femelle [128]. Ainsi, à la collecte, il peut y avoir eu des mutants plus âgés (stades post blastoderme syncytial) exprimant les RBPs zygotiques, ce qui aurait augmenté la quantité mesurée des RBPs. Une alternative pour circonvier ce problème pourrait être d'effectuer des FISH avec des sondes complémentaires aux RBPs et de quantifier leur signal dans le embryons au cycle mitotique d'intérêt. Dans l'ensemble, les résultats de la qPCR ne sont pas concluants, puisqu'il ne s'agit que d'un seul réplica biologique et des optimisations sont nécessaires pour poursuivre l'analyse des autres RBPs. En effet, les écart-type entre les répliques techniques pour le Ct sont supérieurs à 0.25 Ct, soit la valeur normalement voulue pour considérer les valeurs des quantités relatives fiables. Toutefois, hormis ces résultats, trois autres procédures ont été entreprises afin d'évaluer l'impact de la déplétion des RBPs.

Afin de caractériser si la perte d'expression des RBPs affecte le développement de la *Drosophile*, un test de viabilité embryonnaire a été effectué. Les mutants RNAi pour *Rae1*,

Mask, Heph, Bol, rin et a2bp1 ont vu leur viabilité diminuer en comparaison au WT, alors que les mutants RNAi pour Pum, Fib, CG7033, Rbp9 et aret ne pondaient pas d'embryons. Le phénotype observé pour Pum, un répresseur traductionnel jouant un rôle dans la régulation neuronale [129, 130], corrèle avec des données de la littérature. En effet, le mutant ovarette (ovt) perturbant le gène Pum est caractérisé par des *Drosophiles* dont la division asymétrique des cellules souches dans la lignée germinale des ovaires est perturbée [131]. Et, l'expression de Pum dans les ovaires peut rétablir le phénotype d'infertilité des mutants bemused (bem) dont le gène Pum est perturbé [132]. Rbp9, exprimé dans les cellules neuronales [133], est aussi présent de manière transitoire dans les cellules de la lignée germinale de l'ovaire à des stades d'oogenèse précis [134]. De manière intéressante, son expression ectopique dans des phases plus tardives résulte en l'apoptose dans les chambres à œufs des ovaires de *Drosophile* [134], et des mutations de Rbp9 donne lieu à des mouches femelles infertiles avec des problèmes d'oogenèse [135]. Ainsi, l'infertilité observée pour les autres RBPs pourrait être indicative de leur implication dans le développement de la lignée germinale et l'oogenèse, comme c'est le cas pour Pum et Rbp9.

La diminution de la viabilité des autres six mutants RBP-RNAi suggère que ces RBPs soient impliqués dans la régulation d'un processus développemental. Aussi, le pourcentage d'embryons mutants a2bp1-RNAi ayant augmenté de 51% à 67% au troisième jour post-pondaison, cela signifie que des embryons ont pris plus de temps pour se développer en larve. En tenant compte que les RBPs cibles sont des candidats suspectés d'être impliqués dans la localisation d'ARNm mitotiques, tel les ARNm centrosomiaux, le résultat sur la viabilité du mutant a2bp1-RNAi va dans le même sens que des données concernant le rôle du centrosome dans la progression du cycle cellulaire. En effet, il a été reporté que l'absence de centrosomes entraîne un retard dans la complétion de la division cellulaire [62, 63]. Il paraît ainsi attrayant

de penser que *a2bp1* ait un rôle dans la régulation temporelle du développement embryonnaire de la *Drosophile*.

Originellement, afin d'évaluer si les RBPs candidats sont impliqués dans la localisation d'ARN mitotiques, la localisation ARNm mitotiques autres que *cen*, tels *CycB* et *Bsg25D*, devait être analysée par FISH pour les mutants RBP-RNAi. Cependant, par des raisons de temps, seulement le ciblage de *cen* a été étudié.

Le centrosome jouerait un rôle dans la progression du cycle cellulaire, notamment durant la mitose pour la transition de la métaphase vers l'anaphase ou encore pour la complétion de la division cellulaire [62, 80, 83]. Ainsi, un défaut de localisation d'un ARN centrosomique résultant de la déplétion d'un RBP pourrait entraîner la fonction défaillante du centrosome, pouvant engendrer des anomalies mitotiques. Ce RBP serait alors impliqué dans la régulation du transcrit centrosomique et aurait un rôle mitotique.

Tant pour le FISH que pour l'IF, les phénotypes escomptés étaient une localisation anormale de *cen* et des défauts mitotiques tels des fuseaux non bipolaires, une mauvaise ségrégation des chromosomes, des fuseaux mitotiques avec des dimensions différentes, etc. Les résultats des FISH et IF ne montrent aucun phénotype aberrant pour la plupart des RBP-RNAi testés (résultats non montrés). Sur un premier plan, cela pourrait être attribuable à l'échec de la déplétion. Cependant, la quantification des RBPs ne permettant de débattre là-dessus, une autre explication serait que ces RBPs ne jouent aucun rôle dans le ciblage de *cen* au centrosome. Puisqu'il a été prédit que les RBPs sélectionnés possèdent des motifs de liaison à des ARN se localisant à l'appareil mitotique, c'est-à-dire à *cen* ou à d'autres transcrits tels *Bsg25D* et *CycB*, *ens*, *DGrip91*, il reste possible que ces RBPs jouent un rôle dans la localisation de transcrits

autres que *cen*. D'un autre côté, il se pourrait également que ces RBPs soient en fait impliqués dans la régulation de *cen*, mais que leurs rôles ne soient pas indispensables ou que leurs fonctions soient redondantes avec celles d'autres RBPs capables de remplir le même rôle. Il serait également envisageable que la cellule dispose de voies de compensation capables de pallier à la pénurie de la protéine Cen en empruntant un processus métabolique différent et sans conséquences appréciables par FISH et IF dans les jeunes embryons de *Drosophile*.

Par ailleurs, il est important de noter qu'aucune aberration dans la localisation de *cen* ni des défauts mitotiques ont été observés pour les mutants UAS-Dicer-2 (**fig. 9, 10, tableau II**), suggérant que l'introduction de Dicer-2 ne soit pas délétère, malgré la quantité diminuée de RBPs constaté par RT-qPCR.

En contraste au contrôle OreR WT, 4 RBPs présentent une localisation anormale de *cen*. De manière intéressante, les phénotypes observés sont différents et peuvent être classés en deux catégories : marquage diffus accompagné d'un signal dispersé (Bru-2 et CG30122) et un signal plus faible (sc35 et Mask) (**fig. 9, tableau II**). Cette classification suggère que Bru-2/CG30122 et sc35/Mask soient impliqués dans différentes facettes de la régulation de *cen*. En effet, Bru-2 et CG30122 pourraient davantage remplir un rôle dans la stabilité du transcrit, alors que sc35 et Mask pourraient participer à la régulation de l'expression de *cen*.

Les défauts mitotiques résultant du knock-down de 5 RBPs peuvent aussi être classés en différentes catégories : fuseaux monopolaires (Bru-2, Ge-1 et SF2), de la γ -tubuline libre (Bru-3 et Ge-1) et des fuseaux plus petits (Mask) (**fig. 10, tableau II**), suggérant que ces RBPs jouent des rôles distincts dans la régulation de la division cellulaire. Les deux premières catégories pourraient indiquer que ces RBPs soient associés à la cohésion des centrosomes au fuseau

mitotique, alors que des fuseaux plus petits seraient davantage associés à l'élongation des microtubules et impliquerait le rôle en tant que MTOC du centrosome. Bru-3, Ge-1 et SF2 ne montrant pas de phénotype aberrant au niveau de la localisation de *cen*, leurs rôles seraient indépendants de la fonction de Cen ou de son transcrit. Une fois traduite, cependant, Cen pourrait interagir avec Bru-2 et Mask pour réguler la division cellulaire. Il est par ailleurs important de mentionner que, puisque les images des IF dans les embryons sont des sections optiques uniques prises avec un microscope confocal, il se peut que le phénotype visualisé pour les fuseaux monopolaires soit en fait un artefact. En effet, il se pourrait que l'autre extrémité du fuseau ne soit visible dans le plan observé. Des images devront donc être prises dans plusieurs plans de profondeur (axe Z) afin de confirmer le phénotype.

Il est à noter que, bien que la localisation in affectée de l'ARNm *histone H3* dans les mutants RBP-RNAi (**fig. 9**) suggère un knock-down spécifique des RBPs ciblés, la localisation anormale de *cen* et les défauts mitotiques observés pourraient en fait être des phénotypes résultant d'un ciblage non spécifique par les hpRNAs. Ainsi, il faudrait compléter les expériences avec des essais de rétablissement du phénotype (« rescue ») afin de confirmer les effets de la déplétion des RBPs cibles. À cet effet, des fosmides ou des vecteurs BAC (Chromosome bactérien artificiel; Bacterial Artificial Chromosome), contenant le système UAS-GAL4 et l'ADNc du RBP correspondant sous le contrôle du promoteur Nanos, pourraient être injectés dans les embryons de *Drosophila*. L'ADNc devrait alors être construit de manière à ce qu'il contienne des mutations silencieuses sans effet délétère [136] ou encore utiliser des séquences d'autres espèces proches de la *D. melanogaster*, tel *D. pseudoobscura*, ce qui permettrait d'avoir un construit semblable, mais non affecté par le RNAi [137, 138]. En parallèle, la réalisation d'analyses FISH et IF des RBPs candidats sur des mutants nuls disponibles tel

Mask [139] permettrait également de confirmer les phénotypes observés. La réalisation de IF sur les RBPs cibles dans les embryons permettrait également de valider la déplétion.

Une autre particularité à soulever est que la protéine Cen n'est présente dans le blastoderme syncytial qu'à partir du cycle mitotique 10 [140], stade auquel les analyses de FISH et IF ont été faites. Cependant, l'observation d'embryons à des stades antérieurs au cycle mitotique 10 a également été réalisée (données non montrées) et révélait que l'ARNm *cen* était présent aux centrosomes et que sa localisation n'était altérée pour aucun mutant RBP-RNAi. Ces observations, conjointement à la localisation asymétrique de *cen* lors de la duplication des centrosomes à la prophase, ainsi que la présence différentielle de *cen* et Cen aux centrosomes durant la métaphase (**fig. 5** et [120]), suggèrent que *cen* possède également une fonction indépendante de sa capacité codante. Ces observations indiqueraient également que *cen* est temporellement régulé par les RBPs Bru-2, sc35, CG30122 et Mask, puisque la localisation anormale de *cen* n'est observée qu'à partir du cycle mitotique 10 dans les embryons.

Dans l'ensemble, les résultats semblent suggérer que, dans les jeunes embryons de *Drosophile*, Bru-2 et Mask jouent un rôle dans la mitose via la régulation de l'ARNm *cen*. Et parmi ces deux RBPs, Mask constitue un candidat plus intéressant, puisque sa déplétion médiée par RNAi résulte en une diminution de la viabilité embryonnaire. Cependant, les phénotypes ayant été analysés de manière qualitative, il faudrait quantifier davantage les résultats des FISH et IF afin d'établir si les aberrations observées sont significatives. De plus, dans le but d'élucider l'interaction entre ces RBPs et l'ARNm *cen*, il serait pertinent de faire des essais d'immunoprécipitation des RBPs candidats suivi d'une RT-qPCR et d'analyses de séquençage à haut débit afin de constater s'il y a une co-purification de *cen*.

Localisation des RBPs dans les cellules humaines

Des altérations dans la fonction de RBPs ont été associées à des maladies neurologiques (FMR1), d'atrophie musculaire (SMN) ainsi qu'à certains cancers (EIF4E) [141]. À cet égard, dans l'optique d'évaluer la pertinence des phénotypes observés dans *Drosophile* chez l'homme, le deuxième objectif du projet était de vérifier si la fonction mitotique des RBPs candidats était conservée chez l'homme.

Pour aborder cet objectif, la localisation des RBPs au fuseau mitotique et aux centrosomes a été analysée durant la métaphase, où le fuseau pouvait être mieux apprécié. Cela s'est fait par un criblage IF à partir d'une banque d'anticorps dirigés contre plus de 200 RBPs (tous les anticorps ont été testés, mais ceux donnant un signal trop faible, semblable à celui du bruit de fond, ont été écartés de l'analyse). La localisation au niveau du fuseau a été suivie avec l'anticorps anti- α -tubuline et celle aux centrosomes, par l'anti- γ -tubuline. L'analyse des images s'est fait en suivant la méthode illustrée à la figure 11. Certains facteurs ayant été fixés manuellement, telle la délimitation des cellules pour mesurer l'intensité de signal qui ne colocalise pas avec le fuseau et les centrosomes, certains paramètres de ce criblage nécessitent une optimisation, par exemple l'obtention d'une plus grande quantité de cellules en métaphase. L'automatisation de l'analyse des données rendraient également les données plus fiables.

L'évaluation de la localisation aux centrosomes était plus difficile pour les RBPs qui semblent se localiser aux centrosomes et au fuseau mitotique, puisqu'il n'était pas possible de suivre le signal par la méthode Linescan. Ne sachant pas à quoi s'attendre pour le profil de localisation des RBPs, et pour éviter le chevauchement de signal des fluorochromes, le criblage a été fait avec le même anticorps secondaire pour l' α - et γ -tubuline. Cependant, il aurait été

préférable de faire des criblages séparément avec chacun de ces deux marqueurs. Il aurait également été pertinent de rajouter des tests en marquant l' α - et γ -tubuline avec le même fluorochrome utilisé pour les RBPs de manière à avoir une valeur de référence pour un signal de colocalisation exacte.

Des anticorps étaient disponibles pour 4 orthologues des RBPs knock-down dans la mouche (**tableau II**), et parmi ceux-là, les analyses d'IF ont permis de considérer HNRNPUL1 (homologue de CG30122) comme candidat se localisant au fuseau mitotique et, très probablement, aux centrosomes (**fig. 12, 13**). HNRNPUL1 fait partie de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNPs) accomplissant des fonctions dans la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, la biogénèse des télomères, la transcription et jouent aussi des rôles dans le métabolisme des ARN dans le noyau [142]. La localisation de HNRNPUL1 observée dans le criblage, en association avec le marquage anormal de *cen* résultant de la déplétion de CG30122, introduirait l'idée d'un nouveau rôle de HNRNPUL1 durant la mitose pour la régulation de *CDR2*, l'orthologue humain de *cen*.

Quant aux autres RBPs, les résultats concordent avec ceux de la littérature pour NUSAP1 (nucleolar and spindle associated protein 1) qui, comme son nom l'indique s'associe aux microtubules du fuseau et régule leur organisation [143]. La localisation de CDC40 corrèle également avec la littérature. La protéine CDC40 possède des domaines WD trouvés dans des familles de protéines fonctionnellement importantes pour la progression du cycle cellulaire. Et son orthologue Prp17 joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire dans la levure [144]. Il serait donc envisageable que CDC40 accomplisse un rôle dans la régulation de la mitose. Pour

ce qui est des RBPs AKAP1, RBMX2, WDR43, RPS3 et CCDC86, le profil de localisation observé pourrait pointer vers leur possible implication dans des processus mitotiques.

Pour la vaste majorité des RBPs non retenus comme candidats, leur localisation au fuseau et au centrosome a été considérée ambiguë en raison du signal homogène dans les divers compartiments de la cellule. Il pourrait être envisageable que ces RBPs lient de manière non préférentielle le fuseau et qu'ils y soient présents juste de manière transitoire, soit en train d'être transportés vers d'autres sites.

Il est également possible de constater que le profil de localisation des RBPs varie en fonction du stade dans le cycle cellulaire (**fig. 12, fig. suppl. 1**). À la lumière de ces observations, il est attirant de penser que les RBPs identifiés comme se localisant au fuseau puissent exercer une régulation phase-dépendante, à l'instar du RBP HuR. En effet, principalement nucléaire, HuR exhibe une faible expression cytoplasmique durant la G1, mais devient hautement exprimé aux phases S et G2/M, ce qui lui permettrait de stabiliser de manière phase-dépendante divers ARNm cytoplasmiques encodant des protéines importantes pour la régulation du cycle cellulaire [36].

Dans l'ensemble, le criblage par IF a permis de faire ressortir 8 RBPs (NUSAP1, CDC40, HNRNPUK1, AKAP1, RBMX2, WDR43, RPS3 et CCDC86) considérés comme se localisant au fuseau et/ou aux centrosomes. Parmi ces RBP, un tel patron de localisation avait seulement déjà été observé pour NUSAP1. De plus, la déplétion de CG30122, orthologue de HNRNPUL1 dans la *Drosophile*, résultant en une localisation anormale de l'ARNm centrosomique *cen*, cela suggère que HNRNPUL1 soit aussi impliqué dans la régulation de l'ARNm *CDR2* (orthologue de *cen*).

Conclusion

Malgré le caractère plutôt qualitatif que quantitatif des analyses réalisées, les expériences de déplétion médiées par RNAi dans la *Drosophile* ont permis de constater que la déplétion de 4 RBPs spécifiques engendre deux phénotypes distincts de localisation de l'ARNm *cen*, suggérant que les RBPs Bru-2 et CG30122 accomplissent un rôle distinct à celui de sc35 et Mask dans la régulation de *cen*. Parallèlement, les mutants déplétés exhibent aussi des fuseaux mitotiques monopolaires (Bru-2, Ge-1 et SF2), de la γ -tubuline libre (Bru-3 et Ge-1) et des fuseaux plus petits (Mask), suggérant que les RBPs régulent différemment la mitose. Cependant, dans l'ensemble, les résultats semblent suggérer que seulement Bru-2 et Mask jouent un rôle dans la mitose via la régulation de l'ARNm *cen* dans les jeunes embryons de *Drosophile*. De plus, il a été observé par criblage IF dans les cellules HeLa que HNRNPUL1 colocalise au fuseau et aux centrosomes en mitose. La déplétion de son orthologue CG30122 dans la *Drosophile* résultant en une localisation anormale de l'ARNm centrosomique *cen*, cela suggère que HNRNPUL1 soit aussi impliqué dans la régulation de l'ARNm *CDR2* (orthologue de *cen*).

Références

1. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J and Dreyfuss G (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**:1977-86.
2. Cody NA, Iampietro C and Lécuyer E (2013). The many functions of mRNA localization during normal development and disease: from pillar to post. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* **2**:781-96.
3. Becalska AN and Gavis ER (2009). Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development.* **136**:2493-503.
4. Kloc M, Bilinski S, Chan AP, Allen LH, Zearfoss NR and Etkin LD (2001). RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol.* **203**:63-91.
5. Nishida H and Sawada K (2001). *macho-1* encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature.* **409**:724-9.
6. Kloc M and Etkin LD (2005). RNA localization mechanisms in oocytes. *J Cell Sci.* **118**:269-82.
7. Shestakova EA, Singer RH and Condeelis J (2001). The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:7045-50.
8. Liu-Yesucevitz L, Bassell GJ, Gitler AD, Hart AC, Klann E, Richter JD, Warren ST and Wolozin B (2011). Local RNA translation at the synapse and in disease. *J Neurosci.* **31**:16086-93.
9. Paquin N and Chartrand P (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol.* **18**:105-11.
10. Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, Skamagki M, Grabarek JB, Johnson MH, Robson P and Zernicka-Goetz M (2008). Role of *Cdx2* and cell polarity in cell allocation and specification of trophoblast and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev.* **22**:2692-706.
11. Martin KC and Ephrussi A (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell.* **136**:719-30.
12. Tian L and Okita TW (2014). mRNA-based protein targeting to the endoplasmic reticulum and chloroplasts in plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* **22**:77-85.
13. Ham BK, Brandom JL, Xoconostle-Cazares B, Ringgold V, Lough TJ and Lucas WJ (2009). A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell.* **21**:197-215.
14. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ and Lotvall JO (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* **9**:654-9.
15. Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W and Selbach M (2013). Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* **495**:126-7.
16. Smith R (2004). Moving molecules: mRNA trafficking in Mammalian oligodendrocytes and neurons. *Neuroscientist.* **10**:495-500.
17. Jung H, Yoon BC and Holt CE (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci.* **13**:308-24.
18. Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J and Liu G (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci.* **118**:2425-33.
19. Batada NN, Shepp LA and Siegmund DO (2004). Stochastic model of protein-protein interaction: why signaling proteins need to be colocalized. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:6445-9.
20. Lécuyer E, Yoshida H and Krause HM (2009). Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization. *Curr Opin Cell Biol.* **21**:409-15.
21. Jenny A, Hachet O, Zavorszky P, Cyrklaff A, Weston MD, Johnston DS, Erdelyi M and Ephrussi A (2006). A translation-independent role of *oskar* RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development.* **133**:2827-33.
22. Kloc M, Dougherty MT, Bilinski S, Chan AP, Brey E, King ML, Patrick CW, Jr. and Etkin LD (2002). Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol.* **241**:79-93.
23. Lécuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N, Alm C, Babak T, Cerovina T, Hughes TR, Tomancak P and Krause HM (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell.* **131**:174-87.

24. Mignone F, Gissi C, Liuni S and Pesole G (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* **3**:Reviews0004.
25. Long RM, Gu W, Meng X, Gonsalvez G, Singer RH and Chartrand P (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol.* **153**:307-18.
26. Jambhekar A and Derisi JL (2007). Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *Rna.* **13**:625-42.
27. Shahbadian K and Chartrand P (2012). Control of cytoplasmic mRNA localization. *Cell Mol Life Sci.* **69**:535-52.
28. Medioni C, Mowry K and Besse F (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development.* **139**:3263-76.
29. Kronja I and Orr-Weaver TL (2011). Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **366**:3638-52.
30. Lai MC, Chang WC, Shieh SY and Tarn WY (2010). DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1. *Mol Cell Biol.* **30**:5444-53.
31. Groisman I, Jung MY, Sarkissian M, Cao Q and Richter JD (2002). Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell.* **109**:473-83.
32. Novoa I, Gallego J, Ferreira PG and Mendez R (2010). Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nat Cell Biol.* **12**:447-56.
33. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS and Ruggero D (2013). The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Mol Cell.* **52**:574-82.
34. Qin X and Sarnow P (2004). Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem.* **279**:13721-8.
35. Gerber AP, Luschnig S, Krasnow MA, Brown PO and Herschlag D (2006). Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:4487-92.
36. Kim HH and Gorospe M (2008). Phosphorylated HuR shuttles in cycles. *Cell Cycle.* **7**:3124-6.
37. Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H and Gorospe M (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *Embo j.* **19**:2340-50.
38. Yuan Z, Sanders AJ, Ye L, Wang Y and Jiang WG (2011). Knockdown of human antigen R reduces the growth and invasion of breast cancer cells in vitro and affects expression of cyclin D1 and MMP-9. *Oncol Rep.* **26**:237-45.
39. Guo X and Hartley RS (2006). HuR contributes to cyclin E1 deregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**:7948-56.
40. Kullmann M, Gopfert U, Siewe B and Hengst L (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev.* **16**:3087-99.
41. Vitre BD and Cleveland DW (2012). Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol.* **24**:809-15.
42. Guo Y, Kim C and Mao Y (2013). New insights into the mechanism for chromosome alignment in metaphase. *Int Rev Cell Mol Biol.* **303**:237-62.
43. Stearns T and Kirschner M (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell.* **76**:623-37.
44. Groisman I, Huang YS, Mendez R, Cao Q, Theurkauf W and Richter JD (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell.* **103**:435-47.
45. Eliscovich C, Peset I, Vernos I and Mendez R (2008). Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* **10**:858-65.
46. Blower MD, Feric E, Weis K and Heald R (2007). Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol.* **179**:1365-73.
47. Sharp JA, Plant JJ, Ohsumi TK, Borowsky M and Blower MD (2011). Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Mol Biol Cell.* **22**:4312-23.
48. Doxsey SJ, Stein P, Evans L, Calarco PD and Kirschner M (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell.* **76**:639-50.
49. Nigg EA and Stearns T (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol.* **13**:1154-60.

50. Tsou MF and Stearns T (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*. **442**:947-51.
51. Schockel L, Mockel M, Mayer B, Boos D and Stemmann O (2011). Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol*. **13**:966-72.
52. Strnad P, Leidel S, Vinogradova T, Euteneuer U, Khodjakov A and Gonczy P (2007). Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle. *Dev Cell*. **13**:203-13.
53. Loncarek J, Hergert P, Magidson V and Khodjakov A (2008). Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nat Cell Biol*. **10**:322-8.
54. Tsou MF, Wang WJ, George KA, Uryu K, Stearns T and Jallepalli PV (2009). Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev Cell*. **17**:344-54.
55. Palazzo RE, Vogel JM, Schnackenberg BJ, Hull DR and Wu X (2000). Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol*. **49**:449-70.
56. Goto H, Inoko A and Inagaki M (2013). Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell Mol Life Sci*. **70**:3893-905.
57. Loncarek J and Khodjakov A (2009). Ab ovo or de novo? Mechanisms of centriole duplication. *Mol Cells*. **27**:135-42.
58. Khodjakov A, Rieder CL, Sluder G, Cassels G, Sibon O and Wang CL (2002). De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J Cell Biol*. **158**:1171-81.
59. Nogales E (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*. **69**:277-302.
60. Desai A and Mitchison TJ (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **13**:83-117.
61. Avila J (1992). Microtubule functions. *Life Sci*. **50**:327-34.
62. Basto R, Lau J, Vinogradova T, Gardiol A, Woods CG, Khodjakov A and Raff JW (2006). Flies without centrioles. *Cell*. **125**:1375-86.
63. Hinchcliffe EH, Miller FJ, Cham M, Khodjakov A and Sluder G (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science*. **291**:1547-50.
64. Khodjakov A and Rieder CL (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol*. **153**:237-42.
65. Sluder G (2005). Two-way traffic: centrosomes and the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**:743-8.
66. Quintyne NJ and Schroer TA (2002). Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J Cell Biol*. **159**:245-54.
67. Dammermann A and Merdes A (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol*. **159**:255-66.
68. Gromley A, Jurczyk A, Sillibourne J, Halilovic E, Mogensen M, Groisman I, Blomberg M and Doxsey S (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J Cell Biol*. **161**:535-45.
69. Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, Menissier-De Murcia J, Piel M, Schmit AC, Apiou F, Vonesch JL, Kock M, Bornens M and De Murcia G (2003). PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci*. **116**:1551-62.
70. Matsumoto Y and Maller JL (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science*. **306**:885-8.
71. Srsen V, Gnadt N, Dammermann A and Merdes A (2006). Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *J Cell Biol*. **174**:625-30.
72. Bailly E, Pines J, Hunter T and Bornens M (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J Cell Sci*. **101 (Pt 3)**:529-45.
73. Pockwinse SM, Krockmalnic G, Doxsey SJ, Nickerson J, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS and Penman S (1997). Cell cycle independent interaction of CDC2 with the centrosome, which is associated with the nuclear matrix-intermediate filament scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:3022-7.
74. Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, Bartek J and Lukas J (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol*. **6**:884-91.
75. Tsvetkov L, Xu X, Li J and Stern DF (2003). Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem*. **278**:8468-75.

76. Carvajal RD, Tse A and Schwartz GK (2006). Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* **12**:6869-75.
77. Helps NR, Luo X, Barker HM and Cohen PT (2000). NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J.* **349**:509-18.
78. Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F and Zhang W (2009). Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer.* **8**:8.
79. Huang J and Raff JW (1999). The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells. *Embo j.* **18**:2184-95.
80. Wakefield JG, Huang JY and Raff JW (2000). Centrosomes have a role in regulating the destruction of cyclin B in early *Drosophila* embryos. *Curr Biol.* **10**:1367-70.
81. Hendrickson TW, Yao J, Bhadury S, Corbett AH and Joshi HC (2001). Conditional mutations in gamma-tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell.* **12**:2469-81.
82. Prigozhina NL, Oakley CE, Lewis AM, Nayak T, Osmani SA and Oakley BR (2004). gamma-tubulin plays an essential role in the coordination of mitotic events. *Mol Biol Cell.* **15**:1374-86.
83. Nayak T, Edgerton-Morgan H, Horio T, Xiong Y, De Souza CP, Osmani SA and Oakley BR (2010). Gamma-tubulin regulates the anaphase-promoting complex/cyclosome during interphase. *J Cell Biol.* **190**:317-30.
84. Tugendreich S, Tomkiel J, Earnshaw W and Hieter P (1995). CDC27Hs colocalizes with CDC16Hs to the centrosome and mitotic spindle and is essential for the metaphase to anaphase transition. *Cell.* **81**:261-8.
85. Piel M, Nordberg J, Euteneuer U and Bornens M (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science.* **291**:1550-3.
86. Hansen DV, Hsu JY, Kaiser BK, Jackson PK and Eldridge AG (2002). Control of the centriole and centrosome cycles by ubiquitination enzymes. *Oncogene.* **21**:6209-21.
87. Kaiser BK, Zimmerman ZA, Charbonneau H and Jackson PK (2002). Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase. *Mol Biol Cell.* **13**:2289-300.
88. Mailand N, Lukas C, Kaiser BK, Jackson PK, Bartek J and Lukas J (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* **4**:317-22.
89. Lambert JD and Nagy LM (2002). Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature.* **420**:682-6.
90. Alliegro MC, Alliegro MA and Palazzo RE (2006). Centrosome-associated RNA in surf clam oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:9034-8.
91. Alliegro MC and Alliegro MA (2008). Centrosomal RNA correlates with intron-poor nuclear genes in *Spisula* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**:6993-7.
92. Alliegro MC (2011). The centrosome and spindle as a ribonucleoprotein complex. *Chromosome Res.* **19**:367-76.
93. Alliegro MA, Henry JJ and Alliegro MC (2010). Rediscovery of the nucleolus, a dynamic RNA-rich organelle associated with the nucleolus, spindle, and centrosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:13718-23.
94. Muller H, Schmidt D, Steinbrink S, Mirgorodskaya E, Lehmann V, Habermann K, Dreher F, Gustavsson N, Kessler T, Lehrach H, Herwig R, Gobom J, Ploubidou A, Boutros M and Lange BM (2010). Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *Embo j.* **29**:3344-57.
95. Gerstberger S, Hafner M and Tuschl T (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* **15**:829-45.
96. Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, Davey NE, Humphreys DT, Preiss T, Steinmetz LM, Krijgsveld J and Hentze MW (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell.* **149**:1393-406.
97. Baltz AG, Munschauer M, Schwanhaussner B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, Penfold-Brown D, Drew K, Milek M, Wyler E, Bonneau R, Selbach M, Dieterich C and Landthaler M (2012). The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell.* **46**:674-90.
98. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jr., Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M and Tuschl T (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell.* **141**:129-41.

99. Castello A, Horos R, Strein C, Fischer B, Eichelbaum K, Steinmetz LM, Krijgsveld J and Hentze MW (2013). System-wide identification of RNA-binding proteins by interactome capture. *Nat Protoc.* **8**:491-500.
100. Brinkley BR (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* **11**:18-21.
101. Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**:57-70.
102. Basto R, Brunk K, Vinadogrova T, Peel N, Franz A, Khodjakov A and Raff JW (2008). Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell.* **133**:1032-42.
103. Nigg EA and Raff JW (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell.* **139**:663-78.
104. Gerdes JM, Davis EE and Katsanis N (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell.* **137**:32-45.
105. Goetz SC and Anderson KV (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* **11**:331-44.
106. Westfall JE, Hoyt C, Liu Q, Hsiao YC, Pierce EA, Page-McCaw PS and Ferland RJ (2010). Retinal degeneration and failure of photoreceptor outer segment formation in mice with targeted deletion of the Joubert syndrome gene, Ahi1. *J Neurosci.* **30**:8759-68.
107. O'Farrell PH, Stumpff J and Su TT (2004). Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? *Curr Biol.* **14**:R35-45.
108. Foe VE and Alberts BM (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci.* **61**:31-70.
109. Edgar BA, Sprenger F, Duronio RJ, Leopold P and O'Farrell PH (1994). Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **8**:440-52.
110. Grosshans J, Muller HA and Wieschaus E (2003). Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by *fruhstart*. *Dev Cell.* **5**:285-94.
111. Foe VE (1989). Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development.* **107**:1-22.
112. St Johnston D (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.* **3**:176-88.
113. Basto R, Gomes R and Karess RE (2000). Rough deal and *Zw10* are required for the metaphase checkpoint in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* **2**:939-43.
114. Sibon OC, Kelkar A, Lemstra W and Theurkauf WE (2000). DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol.* **2**:90-5.
115. Takada S, Kelkar A and Theurkauf WE (2003). *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell.* **113**:87-99.
116. Parry DH and O'Farrell PH (2001). The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol.* **11**:671-83.
117. Januschke J and Gonzalez C (2010). The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J Cell Biol.* **188**:693-706.
118. Rebollo E, Sampaio P, Januschke J, Llamazares S, Varmark H and Gonzalez C (2007). Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell.* **12**:467-74.
119. Sundararaman B, Zhan L, Blue SM, Stanton R, Elkins K, Olson S, Wei X, Van Nostrand EL, Pratt GA, Huelga SC, Smalec BM, Wang X, Hong EL, Davidson JM, Lecuyer E, Graveley BR and Yeo GW (2016). Resources for the Comprehensive Discovery of Functional RNA Elements. *Mol Cell.* **61**:903-13.
120. Kao LR and Megraw TL (2009). Centrocortin cooperates with centrosomin to organize *Drosophila* embryonic cleavage furrows. *Curr Biol.* **19**:937-42.
121. Barckmann B and Simonelig M (2013). Control of maternal mRNA stability in germ cells and early embryos. *Biochim Biophys Acta.* **1829**:714-24.
122. Yamashita YM (2009). The centrosome and asymmetric cell division. *Prion.* **3**:84-8.
123. Kim K and Rhee K (2011). The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J Cell Sci.* **124**:338-47.
124. Franz A, Roque H, Saurya S, Dobbelaere J and Raff JW (2013). CP110 exhibits novel regulatory activities during centriole assembly in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **203**:785-99.
125. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K and Dickson BJ (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* **448**:151-6.

126. Venken KJ, Simpson JH and Bellen HJ (2011). Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron*. **72**:202-30.
127. Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP and Beabekashvili R (2003). Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J Biotechnol*. **105**:1-9.
128. Bloch Qazi MC, Heifetz Y and Wolfner MF (2003). The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. **256**:195-211.
129. Wreden C, Verrotti AC, Schisa JA, Lieberfarb ME and Strickland S (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development*. **124**:3015-23.
130. Burow DA, Umeh-Garcia MC, True MB, Bakhaj CD, Ardell DH and Cleary MD (2015). Dynamic regulation of mRNA decay during neural development. *Neural Dev*. **10**:11.
131. Lin H and Spradling AC (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*. **124**:2463-76.
132. Schweers BA, Walters KJ and Stern M (2002). The *Drosophila melanogaster* translational repressor pumilio regulates neuronal excitability. *Genetics*. **161**:1177-85.
133. Kim YJ and Baker BS (1993). The *Drosophila* gene *rbp9* encodes a protein that is a member of a conserved group of putative RNA binding proteins that are nervous system-specific in both flies and humans. *J Neurosci*. **13**:1045-56.
134. Jeong K and Kim-Ha J (2003). Expression of Rbp9 during mid-oogenesis induces apoptosis in egg chambers. *Mol Cells*. **16**:392-6.
135. Kim-Ha J, Kim J and Kim YJ (1999). Requirement of RBP9, a *Drosophila* Hu homolog, for regulation of cystocyte differentiation and oocyte determination during oogenesis. *Mol Cell Biol*. **19**:2505-14.
136. Schulz JG, David G and Hassan BA (2009). A novel method for tissue-specific RNAi rescue in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*. **37**:e93.
137. Kondo S, Booker M and Perrimon N (2009). Cross-species RNAi rescue platform in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **183**:1165-73.
138. Langer CC, Ejsmont RK, Schonbauer C, Schnorrer F and Tomancak P (2010). In vivo RNAi rescue in *Drosophila melanogaster* with genomic transgenes from *Drosophila pseudoobscura*. *PLoS One*. **5**:e8928.
139. Smith RK, Carroll PM, Allard JD and Simon MA (2002). MASK, a large ankyrin repeat and KH domain-containing protein involved in *Drosophila* receptor tyrosine kinase signaling. *Development*. **129**:71-82.
140. Kao LR and Megraw TL (2009). Centrocortin Cooperates with Centrosomin to Organize *Drosophila* Embryonic Cleavage Furrows. *Curr Biol*. **19**:937-942.
141. Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW and Richard S (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet*. **24**:416-425.
142. Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT and Murray GI (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochim Biophys Acta*. **1765**:85-100.
143. Raemaekers T, Ribbeck K, Beaudouin J, Annaert W, Van Camp M, Stockmans I, Smets N, Bouillon R, Ellenberg J and Carmeliet G (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol*. **162**:1017-29.
144. Ben Yehuda S, Dix I, Russell CS, Levy S, Beggs JD and Kupiec M (1998). Identification and functional analysis of hPRP17, the human homologue of the PRP17/CDC40 yeast gene involved in splicing and cell cycle control. *Rna*. **4**:1304-12.

Annexe

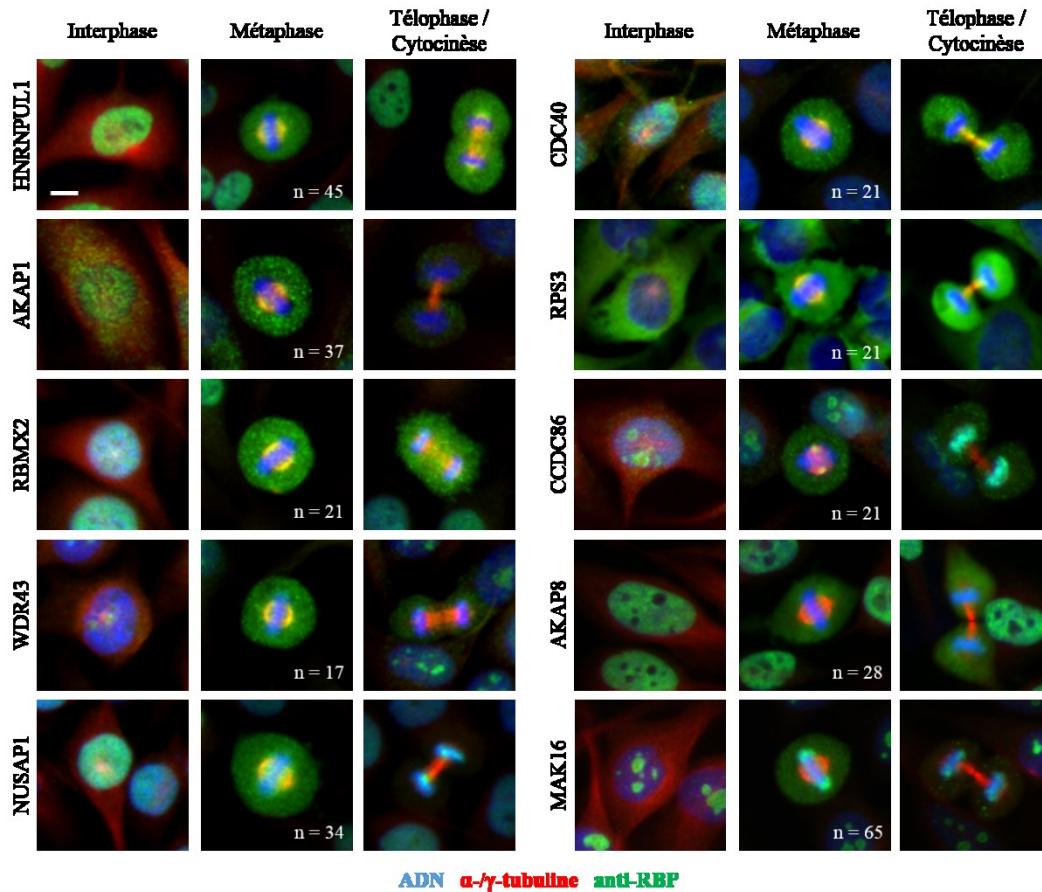


Fig. suppl. 1. Localisation différentielle dans le cycle cellulaire des RBPs montrant une localisation au niveau du fuseau mitotique et/ou du centrosome dans les cellules HeLa en métaphase. Les cellules HeLa ont été synchronisées avec un double blocage de thymidine. Les critères d'analyse présentés à la figure 11 ont été suivis. Des anticorps anti-RBP ont été utilisés conjointement à des anticorps anti- α -tubuline (marqueur du fuseau mitotique) et anti- γ -tubuline (marqueur du centrosome) marqués avec le même anticorps secondaire. Le nombre « n » correspond au nombre de cellules en métaphase qui ont été analysées. Les cellules en Interphase et Téléphase/Cytocinèse ont été évaluées de manière qualitative. La barre d'échelle représente 10 μ m.