

MOHAMED TAHA MOUTAOUIK

**Granules de stress cytoplasmiques à ARN induits
par le rayonnement ultraviolet (UV)**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

© Mohamed Taha MOUTAOUIK, 2012

RÉSUMÉ

Chez les eucaryotes, différents types de granules à ARN sont des acteurs importants dans les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

L'irradiation aux UV induit la formation des petits granules cytoplasmiques (GUV) qui ne sont pas des processing bodies et qui semblent être une nouvelle sous classe de granules de stress. Ces granules n'ont pas la même cinétique de formation et de disparition ainsi que la taille, le nombre et la capacité de fusion que les granules de stress classiques. D'autre part, la formation de ces granules UV ne semble pas affecter le niveau de traduction, ni d'induire la réponse au stress. Toutefois, nous avons observé que l'apparition des granules coïncide avec l'arrêt de la prolifération cellulaire. En effet, dans les conditions expérimentales utilisées, la prolifération est décalée de 24 à 48 h selon la dose d'irradiation.

L'ensemble de ces observations suggère fortement l'existence, d'une nouvelle sous classe de granules de stress induit par les UV, dont le rôle semble être la répression de la traduction des ARNm codant pour des facteurs importants de prolifération cellulaire.

REMERCIEMENTS

Ce travail s'est déroulé au laboratoire du professeur Edward KHANDJIAN au Centre de recherche Université Laval Robert Giffard (CRULRG).

Je voudrais d'abord remercier le Pr. Edward KHANDJIAN de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir donné les moyens pour suivre ma formation et surtout pour toutes les connaissances qu'il a su me transmettre durant mon séjour. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et toute ma profonde reconnaissance.

Je tiens plus particulièrement à exprimer mes remerciements au Dr Rachid EL FATIMY pour sa disponibilité, pour les intenses et rationnelles discussions et de m'avoir encadré au laboratoire et sur la réflexion scientifique malgré son occupation et temps chargé. Je lui suis très reconnaissant.

Je remercie vivement Pr. Robert TANGUAY et Pr. Rachid MAZROUI d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement Pr. Rachid MAZROUI, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le matériel, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je remercie Cristina GAREAU qui m'a aidé pour le marquage d'ARN, merci pour les conseils techniques.

Je remercie Hana Daoud d'avoir initié ce travail, Alain Dury, Samuel Seguin et Sandra Tremblay pour les conseils techniques tout au long de ma maîtrise.

Je remercie énormément ma famille qui m'a soutenu et me soutient toujours.

Je remercie également tous les membres du centre de recherche Université Laval Robert Giffard et tous les responsables du programme de biologie cellulaire et moléculaire, pour les efforts durant ces deux ans de maîtrise et de la bonne formation qui nous a été dispensée.

Je n'oublie pas mes amis et je les remercie pour m'avoir supporté et pour leur bon humour.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	<i>i</i>
REMERCIEMENTS	<i>ii</i>
TABLE DES MATIÈRES	<i>iii</i>
LISTE DES TABLEAUX	<i>v</i>
LISTE DES FIGURES	<i>vi</i>
LISTE DES ABRÉVIATIONS	<i>vii</i>
I- INTRODUCTION	<i>1</i>
I- 1 Généralités	<i>1</i>
I- 2 Stress et protéines de choc thermique	<i>2</i>
I- 3 Les Granules de Stress (GS)	<i>3</i>
a- Découverte et composition des GS	<i>3</i>
b- Induction et assemblage des GS	<i>6</i>
c- Dynamique des GS	<i>12</i>
d- Fonction des GS et leurs implications dans différents systèmes de régulation	<i>12</i>
e- GS et l'apoptose.....	<i>13</i>
f- GS et le cytosquelette	<i>14</i>
I- 4 Les Processing Bodies (P-bodies)	<i>16</i>
a- Découverte et composition des P-bodies	<i>16</i>
b- Fonctions des P-bodies	<i>18</i>
c- Dynamique et mobilité des P-bodies	<i>21</i>
d- P-bodies et le cytosquelette.....	<i>21</i>
I- 5 Les interactions GS et P-bodies	<i>22</i>
I- 6 D'autres types de granules à ARN cytoplasmiques	<i>24</i>
a- Les granules des cellules germinales	<i>24</i>
b- Les granules des cellules neuronales	<i>24</i>
c- Les granules UV chez la levure	<i>25</i>
d- Les granules cytoplasmique antiviral	<i>25</i>
I- 7 La protéine FMRP et GS	<i>26</i>
I- 8 Rayonnements Ultra-violet et leurs impacts biologiques	<i>27</i>
Problématiques	<i>28</i>
II-MATÉRIEL ET MÉTHODES	<i>29</i>
II- 1 La culture cellulaire	<i>29</i>
II- 2 Le traitements des cellules	<i>29</i>
a- Irradiations des cellules aux UV et récupération	<i>29</i>
b- Traitement à l'arsénite de sodium.....	<i>29</i>
c- Choc thermique.....	<i>30</i>
II- 3 La prolifération cellulaire	<i>30</i>

II- 4 L'immunofluorescence indirecte	30
II- 5 L'hybridation avec polydT	32
II- 6 Le «CELL GHOST ».....	32
II- 7 La microscopie	32
II- 8 L'extraction des protéines et immunobuvardage	32
a- Extraction des protéines.....	32
b- Coloration au bleu de Coomassie et quantification	33
c- Électro-transfert sur membrane de nitrocellulose	33
d- Immunobuvardage	33
II- 9 Le marquage au ³⁵S.....	34
II- 10 L'analyse des polyribosomes sur gradient de sucrose.	34
<i>III- RESULTATS.....</i>	35
III-1 Les UVC et la formation de petits granules cytoplasmiques.....	35
III- 2 Effets des UV sur la viabilité et la prolifération cellulaire.	40
III- 3 Caractérisation des granules cytoplasmiques induits par les UV	42
a- Marqueurs des P-bodies.....	42
b- Marqueurs des granules de stress.....	46
c- GUV et les microtubules.....	55
d- Effets de la cycloheximide.....	57
e- Granules induits par UV et la phosphorylation du facteur eIF2 α	58
g- Irradiation aux UV et la traduction	60
h- UV et induction de la réponse au stress (Hsp)	62
<i>IV- DISCUSSION.....</i>	64
<i>V- CONCLUSION.....</i>	67
<i>VI-ANNEXE.....</i>	69
<i>VII- RÉFÉRENCES.....</i>	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte	31
Tableau II : Caractéristiques des anticorps utilisés en western blot	34
Tableau III : Comparaison des granules de stress induits par UV et par l'arsénite de sodium.	65
Tableau IV : Les principaux composants des granules de stress	69
Tableau V : Les principaux composants des P-bodies	75

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1 : La réponse au stress par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 2α chez les eucaryotes.	7
Figure I. 2 : Modèle d'assemblage des granules de stress.	11
Figure I. 3 : Modèle des microtubules et des moteurs moléculaires dans la dynamique des granules de stress.	15
Figure I. 4 : Voies de dégradation des ARNm chez les eucaryotes.	19
Figure I. 5 : Modèle montrant la relation entre GW/P bodies, et les granules de stress et les granules de transport neuronaux et leurs composants.	23
Figure III. 1 : Les UV induisent la formation de petits foyers cytoplasmiques dans les deux lignées cellulaires 3T3 et HeLa.	37
Figure III. 2 : Cinétique d'apparition des granules cytoplasmiques induits par irradiation aux UVC et par le sodium d'arsénite.	39
Figure III. 3 : Cinétique d'apparition des granules cytoplasmiques, 24h après l'irradiation au UVC à différents doses chez la lignée cellulaire 3T3.	40
Figure III. 4 : Taux de prolifération cellulaire après traitement à différentes doses UVC dans la lignée cellulaire 3T3.	41
Figure III. 5 : Analyse des granules contenant FMRP et les marqueurs de processing bodies.	44
Figure III. 6 : Quantification du nombre moyen de P-bodies par cellules.	45
Figure III. 7 : Colocalisation de FMRP et FXR1P dans les GUV et GS.	47
Figure III. 8 : Analyse des GUV et les marqueurs de GS (PABP, S6 et eIF4G) par approche cellule totale.	50
Figure III. 9 : Analyse des GUV et les marqueurs de GS (PABP, S6 et eIF4G) par approche de « Cell Ghost».	53
Figure III. 10 : Les granules induits par les UV contiennent de l'ARNm poly (A) ⁺	54
Figure III. 11 : Les granules induits par les UV sont associés aux microtubules.	56
Figure III. 12 : Les granules contenant FMRP induits par les UV se dissocient après le traitement à la cycloheximide.	57
Figure III. 13 : Les granules induits par UV se forment indépendamment de la phosphorylation du facteur eIF2 α	59
Figure III. 14 : Les UV ne causent pas un arrêt de la traduction	61
Figure III. 15 : Expression des protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine ³⁵ S.	62
Figure III. 16 : Analyse par immunobuvardage « Western blot » des protéines exprimées par les différents types de stress.	63
Figure IV. 1 : Modèle de la formation des granules induits par UV et les granules de stress induit par l'arsénite de sodium.	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	: degré Celsius
α	: alpha
β	: bêta
γ	: gamma
μ ci	: microcurie
μ m	: micromètre
3T3	: Mouse embryonic fibroblast cell line
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AKAP350A	: The protein kinase A-anchoring proteins 350A
ARE	: Adenylate Uridylate rich element
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNt _i	: ARN de transfert initiateur
Ars	: Arsénite de sodium
AsNaO ₂	: Arsénite de sodium
ATP	: Adénosine-5'-triphosphate
AVG	: Antiviral Cytoplasmique Granules
BRF1	: Butyrate Response Factor-1
BS	: Bovin serum
CO ₂	: dioxyde de carbone
CPEB	: Cytoplasmic polyadenylation element binding protein
CUGBP	: (CUG) _n triplet repeat RNA-binding protein (CUGBP)
DAPI	: Dihydrochlorure de 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCP	: Enzyme de décoiffage de l'ARN
DIS1	: protein (Disrupted in schizophrenia 1)
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	: Dithiotréitol
ECL	: Electrochemoluminescence
EGP	: eIF4E, eIF4G et Pab1-containing bodies
eIF	: Facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes
eIF2 α -P	: Facteur d'initiation de la traduction 2 alpha phosphorylé
FAK	: La kinase d'adhésion focale
FAST	: Phosphoprotéine serine/thréonine activée par Fas
FBS	: Fœtal bovine serum
FCCP	: p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone
FISH	: Hybridation fluorescente in situ
FMRP	: Fragile mental retardation protein
FRAP	: Fluorescence Recovery After Photobleaching)
FXR1P	: Fragile X related 1 protein
FXR2P	: Fragile X related 2 protein
G3BP	: Protéine de liaison au domaine SH3 de Ras-GAP
GAH	: Goat anti human
GAM	: Goat anti mouse

GAPDH	: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAR	: Goat anti rabbit
GCN2	: General control nonrepressed 2
GDP	: Guanosine diphosphate
Grb7	: Growth factor receptor-bound protein 7
GS	: Granules de stress
GTP	: Guanosine triphosphate
GUV	: Granules induits par les UV
GW182	: Protéine riche en Glycine (G) et en Tryptophane (W) de 182 kD
h	: Heure
HCl	: Chlorure d'hydrogène
HeLa	: Lignée cellulaire humaine
HRI	: Haem-regulated inhibitor kinase
HRP	: Horseradish peroxydase
HSG	: Heat shock Stress Granules
HSP	: Protéine de choc thermique
HuR	: Human antigen R
IGF-II	: Insuline-like Growth Factor II
InsP ₆	: Inositol hexakisphosphate
IP5K	: Ins(1,3,4,5,6)P ₅ 2-kinase
J/m ²	: Joule par mètre carré
KCl	: Chlorure de potassium
kDa	: KiloDalton
KH	: K Homology
KH ₂ PO ₄	: Dihydrogène monophosphate de potassium
LSm	: Sm-like proteins
mA	: Milli-ampère
MEF	: Mouse embryonic fibroblast cell line
MgCl ²	: Chlorure de magnésium
min	: Minute
miRNA	: microRNA
mm	: Millimètre
mM	: Milli-molaire
Na ₂ HPO ₄	: Phosphate de sodium dibasique
NaCl	: Chlorure de sodium
NES	: Nuclear export signal
NF-KB	: Facteur-kappa B nucléaire
ng	: nano-gramme
NLS	: Nuclear localization sequence
Nm	: Nano-mètre
NMD	: Non-sense-mediated decay
NP 40	: Nonidet P40
O-GlcNAc	: O-acetyl-glucosamination
PABP1	: Poly A binding protein 1
P-bodies	: Processing bodies
PBS	: Solution saline tamponnée au phosphate

PERK	: PKR-like ER kinase
PFA	: Paraformaldehyde
pg	: Pico-gramme
pm	: Pico-mètre
PM	: Poids moléculaire
PMR1	: RNase associée aux polyribosomes
PRD	: Prion-related domain
PTC	: Premature translation termination codon
Rap55	: RNA-associated protein 55
RGG	: Glycine-Arginine riche
RISC	: RNA-Induced Silencing
rmp	: Tour par minute
RNP	: Ribonucléoprotéines
RNPm	: Complexe ribonucléoprotéique du messenger
RRM	: Motif de reconnaissance à l'ARN
s	: Second
SDS	: Dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	: Small interfering RNA
SMN	: Survival of motor neuron
TIA-1	: T-cell Intracellular Antigen-1
TIAR	: TIA-1-related protein
TNF	: Facteur nécrosant des tumeurs
TRAF2	: TNF receptor associated factor 2
TTP	: Tristetraproline
Tub	: Tubuline
UPF	: Regulator of nonsense transcripts
UV	: Ultra-violets
V	: Volt
W	: Watt
Xrn1	: Exoribonucléase
ZBP1	: Zipcode binding protein 1

Chapitre I :

Introduction

I- INTRODUCTION

I- 1 Généralités

Chez les eucaryotes la cellule se compose d'un noyau et d'un cytoplasme entourés par une membrane plasmique. Le noyau renferme la molécule portant l'information génétique : l'Acide désoxyribonucléique (ADN).

Toutes les cellules d'un organisme possèdent les mêmes gènes, mais ne les expriment pas au même endroit ni au même moment. L'expression des gènes doit être finement régulée à tout moment. Cette régulation de l'expression des gènes implique des mécanismes multiples et complexes.

La transcription permet de réguler le passage de l'ADN à l'ARN (Acide ribonucléique). Cette étape est catalysée par des enzymes (ARN polymérase) et de nombreux facteurs de transcription, suivi par l'ajout de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN au niveau du transcrit primaire et élimination des introns par épissage et l'ajout de la queue poly (A)⁺ à l'extrémité 3' de l'ARN. L'ARNm mature est exporté par la suite du noyau vers le cytoplasme pour la traduction.

Dans le cytoplasme, les ARNm sont aussi soumis à un contrôle de qualité par des mécanismes de régulation qui favorisent la dégradation ou la répression de la traduction des ARNm. Ces mécanismes peuvent être déclenchés par des protéines de liaison à l'ARN spécifiques et aussi par de petites ARN non codants régulateurs dans un processus connu sous "RNA-mediated gene silencing".

La régulation post-transcriptionnelle représente un moyen rapide pour contrôler la synthèse des protéines, c'est une étape importante de la régulation de l'expression des gènes dans divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques tels que le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, le cancer et dans les mécanismes de stress.

I- 2 Stress et protéines de choc thermique

L'un des premiers types de stress étudié a été le choc thermique en 1962 par Ferruccio Ritossa. Il a noté l'apparition de gonflements sur les chromosomes polytènes de *Drosophila buckii* suite à un choc thermique (Ritossa, 1962). Dix ans plus tard, en 1974 Tissières et al (1974) ont démontré que le choc thermique induisait la synthèse d'un petit nombre de polypeptides et réprimait la synthèse de plusieurs autres. Par la suite, d'autres chercheurs ont montré que ces gonflements observés étaient le site d'une transcription intense d'ARNm codant pour des protéines très conservées dans l'évolution impliquées dans la réponse au stress (choc thermique, stress environnementaux variés et nombreux processus cellulaires ou situations physiopathologiques), appelées les protéines de choc thermique (HSP) ou chaperons.

Ces protéines, variables en quantité et en variété, participent à de nombreux processus cellulaires destinés à faciliter la survie de la cellule et donc de l'organisme dans son intégralité. Suite à un stress, les chaperons aident certaines protéines dans leur repliement afin de prévenir les agrégats, de réparer les mauvais repliements protéiques ou d'engager les protéines mal repliées ou agrégats dans les voies de dégradation comme protéasome.

Les HSP ont été divisées en cinq grandes familles, selon leur poids moléculaire et leur homologie de séquence a savoir : HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP. Les membres de la famille HSP70 varient entre 66 et 78 kDa, localisées dans plusieurs compartiments cellulaires : le cytosol, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Cependant certains HSP70 se retrouvent au noyau suite à un choc thermique ou un stress oxydant pour retourner graduellement au cytoplasme durant la récupération (Arrigo et al., 1980, Velazquez et al., 1980). Le premier rôle décrit des HSP70 est la résistance au stress ou thermotolérance (Li et Werb., 1982). La thermotolérance se définit comme une adaptation en donnant aux cellules les possibilités de prévenir et résister au stress (Weber., 1992, Parsell et al., 1993). Le rôle le plus connu de HSP70 est la participation au niveau du repliement des protéines et dégradation des protéines instables, par liaison à des courts segments hydrophobiques de protéines partiellement repliées afin d'empêcher les interactions non spécifiques et former des agrégats (Craig et al., 1999).

I- 3 Les Granules de Stress (GS)

En réponse aux stress, les cellules eucaryotes reprogramment le métabolisme des ARNm afin de réparer les dommages causés par le stress et s'adapter aux nouvelles conditions environnementales. Le stress cellulaire affecte fortement les événements de traduction, transcription, épissage, stabilité des ARNm et export nucléo-cytoplasmique des transcrits (pour revue, voir Jolly et Morimoto., 1999).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux effets du stress sur la synthèse des protéines, qui se traduit d'une part par une inhibition générale de la traduction des protéines des gènes d'entretien et d'autre part par l'activation de la traduction de certains chaperons moléculaires, protéines de réparation et de survie cellulaire chez la plupart des organismes vivants. Ceci se manifeste par un arrêt des fonctions de base pour faire place aux mécanismes de réponse au stress, afin de permettre à la cellule de survivre.

a- Découverte et composition des GS

Les granules de stress cytoplasmiques ont été observés pour la première fois dans les années 80 dans le cytoplasme de cellules de tomate (*Lycopersicon peruvianum*) ayant subi un choc thermique (de 37° à 40°C). Ces structures renferment la plupart des ARNm codant pour les protéines cellulaires, mais pas d'ARNm codant pour les HSP (Nover et al., 1983, 1989). Ces foyers nommés granules de stress hyperthermiques (HSG : Heat shock Stress Granules) sont le lieu d'accumulation des ARNm dont la traduction est réprimée durant le stress, tandis que les ARNm de réponse au stress tel que les ARNm codant pour des chaperons et pour les enzymes de réparation de dommage et de survie sont spécifiquement exclus, leur traduction restant active et plus fortement induite pour certains. Plus tard, en 1999 suite à l'observation de Kedersha et al par immunofluorescence dans les cellules de mammifères (DU145 et COS-7), les protéines inhibitrices de la traduction TIA-1 (T-cell Intracellular Antigen-1) et TIAR (TIA-1-related protein), se relocalisent dans des foyers cytoplasmiques en réponse à différents types de stress comme le choc thermique ou le stress oxydatif (Kedersha et al., 1999). L'observation d'ARNm avec une queue poly (A)⁺ dans ces foyers suggère la même

fonction des granules de stress chez les mammifères (GS) et chez les plantes (HSG) : stockage des ARNm non traduits durant le stress.

Les approches utilisées pour déterminer la composition des granules de stress sont la microscopie à fluorescence, l'immuno-microscopie électronique et l'hybridation fluorescente in situ (FISH pour Fluorescent In Situ Hybridization). Jusqu'à aujourd'hui, il n'a pas été possible de purifier ces entités par une approche biochimique pour les analyser. Les granules de stress sont insolubles par les détergents non-ioniques (Mazroui et al., 2002) et sont résistants aux traitements enzymatiques (RNase A, DNase, lavages en sels et la chymotrypsine) (Lapointe, 2004), ce qui explique la difficulté de les étudier.

Dans les années 1980, les granules de stress (HSG) avaient été identifiés par la présence des HSP de faible poids moléculaire (Nover et al., 1983, Collier et al., 1988). Depuis, plusieurs protéines ont été identifiées comme faisant partie des granules de stress (Tableau IV).

Ces granules contiennent de l'ARNm et des éléments de la machinerie de traduction avec toutefois l'absence de la grande sous-unité ribosomale et la présence du complexe de pré-initiation 48S* inactif, qui comprennent les protéines de la petite sous-unité ribosomale, les facteurs d'initiation de la traduction eIF1A, eIF2, eIF3 en plus d'autres facteurs d'initiation de la traduction comme; eIF2B, eIF4A, eIF4B et eIF4E et eIF4G. (Tableau IV) (Kedersha et al., 1999, 2002, Kimball et al., 2003, Stoecklin et al., 2004). Pour le facteur d'initiation de la traduction eIF2 sa présence dans les GS est en question. Dans un premier temps Kedersha et al., 2002 ont noté l'absence de ce facteur dans les GS induits par l'arsénite de sodium et dans un deuxième temps, deux autres études montrent que les GS formés suite au traitement à la thapsigargine (Kimball et al., 2003) et à la patéamine (Dang et al., 2006) comprennent le facteur d'initiation eIF2. L'absence de machinerie traductionnelle fonctionnelle dans les GS suggère que ces derniers contiennent des ARNm dont l'initiation de la traduction est bloquée, alors qu'une fois le stress cellulaire surmonté il pourrait y avoir une reprise de la traduction des messagers réprimés dans ces structures.

Les GS contiennent aussi de nombreuses protéines de liaison à ARN, qui régulent la structure et la fonction de l'ARNm; y compris la protéine PABP1 (Poly A binding protein 1) qui se lie à la queue poly(A)⁺ des ARN messagers (Kedersha et al., 1999), les protéines

impliquées dans le transport d'ARNm comme la protéine Staufén (Thomas et al., 2005), la régulation de la traduction d'ARNm comme Fragile X mental retardation protein (FMRP), ses homologues FXR1P, FXR2P (Mazroui et al., 2002), la protéine CPEB (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein) (Wilczynska et al., 2005) et la protéine Caprin-1 (Solomon et al., 2007), la présence de la protéine SMN (survival of motor neuron) (Hua et Zhou., 2004) impliquée dans l'assemblage et la maturation des ribonucléoprotéines (RNP), les protéines impliquées dans la répression de la traduction TIA-1 et TIAR (Kedersha et al., 2005) et des protéines agissant comme des régulateurs positifs (HuR) (Gallouzi et al., 2000) ou négatifs TTP (Tristetraproline) et son paralogue BRF1 (Butyrate Response Factor-1) (Stoecklin et al., 2004) de la stabilité des ARNm.

De plus, les GS contiennent des éléments de la dégradation de l'ARNm comme la protéine Argonaute 1-4 (Leung et al., 2006) impliquée dans la régulation de la voie des microARN, l'hélicase RCK (p54) (Wilczynska et al., 2005), et le 5'-3' exonucléase Xrn1 (Kedersha et al., 2005). En plus d'autres protéines avec des propriétés enzymatiques comme G3BP (Tourrière et al., 2003) et la ribo-endonucléase associée à Ras-GAP (Tourrière et al., 2003), l'endonucléase PMR1 (Yang et al., 2006 b), la déaminase de cytidine APOBEC3G (Gallois-Montbrun et al., 2007, Kozak et al., 2006). Aussi les facteurs comme Rap55 (RNA-associated protein 55, LSml4) (Yang et al., 2006 a) et Grb7 (growth factor receptor-bound protein 7) (Tsai et al., 2008).

Enfin les GS, contiennent des éléments de cascade de signalisation intracellulaire; comme la protéine TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) impliquée dans la voie d'activation de NF- κ B par le TNF α (Kim et al., 2005) et l'IP5K (Ins(1,3,4,5,6)P₅ 2-kinase) (Brehm et al., 2007) qui synthétise l'inositol hexaphosphate (InsP₆), un signal intracellulaire connu pour avoir plusieurs fonctions. Les GS contiennent également des protéines d'échafaudage comme Fas-activated serine/threonine phosphoprotein (Kedersha et al., 2005).

On ignore le mécanisme de sélection des ARN messagers ainsi que la portion de ces ARNm poly (A)⁺ dans les GS suite à un stress. Kedersha et al., 1999 supposent que 50% des ARNm poly (A)⁺ totaux sont recrutés dans les GS. Les analyses par FISH ont montré que les ARNm endogènes codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'actine β , le c-MYC, le facteur de croissance IGF-II (Insuline-like Growth

Factor II) et H19 sont quantitativement recrutés dans les GS (Stöhr et al., 2006), alors que les ARNm codant pour les HSP70 (Kedersha et al., 2002) et les HSP90 (Stöhr et al., 2006, Kedersha et Anderson P., 2002) sont exclus.

b- Induction et assemblage des GS

Contrairement à d'autres types de granules à ARN, les GS ne sont pas présents dans les cellules en conditions normales, ils sont rapidement induits en réponse à un stress. Au bout de quelques minutes de stress de petits GS commencent à se former, pour ensuite se fusionner et donner des granules plus volumineux. Une fois le stress terminé, ces granules se dissocient en quelques heures (figure I. 2) (Anderson et Kedersha., 2002, 2008).

Étape 1 : Blocage d'initiation de la traduction et désassemblage du ribosome:

Dans les conditions normales, durant l'initiation de la traduction, le facteur d'initiation de la traduction 2 (eIF2) (composé de trois sous unités α , β et γ) forme un complexe avec le GTP et l'ARN de transfert initiateur (ARN_t_i), le méthionyl-ARN_t_i (met-ARN_t_i). Ce complexe, appelé complexe ternaire (figure I. 1) qui fixe ensuite la petite sous-unité ribosomale 40S, pour former le complexe de pré-initiation 43S. Par la suite sous l'action du complexe d'initiation eIF4F, formé par eIF4A, eIF4E et eIF4G, l'ARN messager lie le complexe 43S pour former le complexe de pré-initiation 48S (pour revue, McKendrick et al., 1999). Par la suite le GTP lié à eIF2 est hydrolysé en GDP et les facteurs d'initiation sont alors relâchés du ribosome, et la phase d'élongation peut commencer. (Clemens., 2001, Holcik et Sonenberg., 2005).

La phosphorylation de la sérine 51 du facteur eIF2 α suite au stress par une famille des kinases (GCN2 : general control non-derepressible-2, PKR : protein kinase RNA, HRI : haem-regulated inhibitor kinase et PERK : PKR-like ER kinase), selon le type du stress, convertit le facteur eIF2 α en (eIF2 α -Phosphorylé : eIF2 α -P) inhibiteur compétitif du facteur eIF2B, ce qui empêche l'échange de GDP en GTP, et inhibe la formation du complexe ternaire fonctionnel et conduit donc au blocage de l'initiation de la traduction et désassemblage des polysomes (Figure I. 1) (Kedersha et al., 1999).

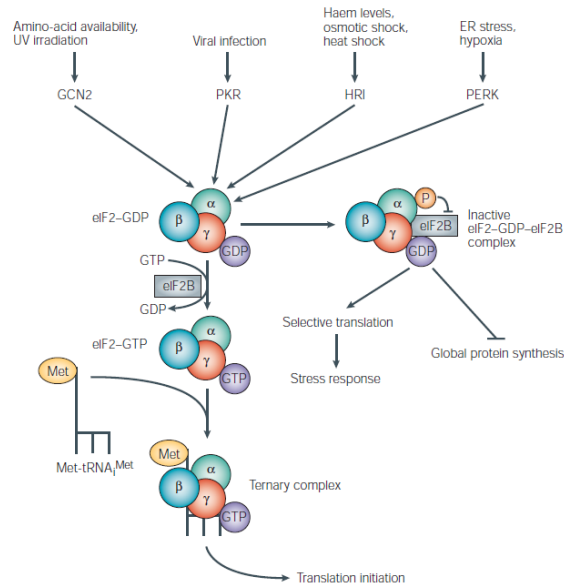


Figure I. 1 : La réponse au stress par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 2α chez les eucaryotes.

Plusieurs types de stress peuvent induire la phosphorylation du facteur eIF2 α par des kinases ce qui réduit l'échange de GDP–GTP par séquestration eIF2B. Ce qui conduit à l'inhibition globale de la traduction. (Adapté de Holcik et Sonenberg, 2005).

Des observations suggèrent que la phosphorylation du eIF2α est réversible, nécessaire et suffisante pour la formation des GS. En effet l'expression d'un mutant mimant la phosphorylation du facteur eIF2α de façon stable est suffisante pour induire l'assemblage des GS (Kedersha et al., 1999). Le contrôle inversé par expression d'un mutant (S51A) non-phosphorylable d'eIF2α chez les fibroblastes de souris bloque la formation des GS après exposition à l'arsénite de sodium (Kedersha et al., 2002). Ces mêmes fibroblastes vont exprimer des GS s'elles sont transfectées par la construction qui mime la phosphorylation du facteur eIF2α (S51D) (McEwen et al., 2005). L'inhibition de l'initiation de la traduction par l'absence de la grande sous unité ribosomale 60S n'induit pas forcément la formation des GS (Mokas et al., 2009), à la différence de l'inhibition de l'initiation de la traduction à l'étape du recrutement de la petite sous-unité ribosomale (40S), par l'inactivation de l'eIF4A ou l'eIF4G qui conduit à la formation des GS (Mazroui et al., 2006).

Étape 2 : agrégation primaire et nucléation des GS :

Il est important de noter que de nombreuses protéines associées au GS permettent leurs assemblage, lorsqu'elles sont surexprimées (par exemple, TIA-1 ou TIAR (Gilks et al., 2004), TTP ou BRF1 (Stoecklin et al., 2004), G3BP (Tourrière et al., 2003), RCK (Wilczynska et al., 2005), Caprin-1 (Solomon et al., 2007), CPEB (Wilczynska et al., 2005), FAST (Kedersha et al., 2005), FMRP et FXR1P (Mazroui et al., 2002), Argonaute-2 (Leung et al., 2006), LINE1 ORF1p (Goodier et al., 2007), SMN (Hua et Zhou, 2004), Smaug (Baez et Boccaccio, 2005), DIS1 (Ogawa et al., 2005). Au contraire, d'autres protéines peuvent inhiber l'assemblage des GS (par exemple Ataxin-2 (Nonhoff et al., 2007), le domaine "Prion-related domain" (PRD) de la protéine TIA-1 (Gilks et al., 2004) et le mutant de G3BP (Tourrière et al., 2003).

L'agrégation primaire est médiée par les protéines qui initient l'agrégation des RNPm comme TIA-1, TIAR, TTP, BRF1, FMRP, FXR1, CPEB, G3BP et SMN lesquelles constituent le noyau des GS (pour revue Anderson et Kedersha, 2008). De plus, le défaut d'expression d'un certain nombre de ces protéines, comme FMRP, FXR1P, (Mazroui et al., 2002), PABP (Mokas et al., 2009) et Staufen1 (Thomas et al., 2005) n'empêche pas l'induction des GS. À l'opposé, l'absence de TIA-1 provoque une inhibition de la formation des GS (Gilks et al., 2004). Une fois la nucléation initiée, d'autres constituants s'ajoutent comme eIF3, eIF4F, PABP-1 et la petite sous-unité ribosomale pour former le coeur des GS.

Étape 3 : Agrégation secondaire

Les modifications post-traductionnelles des composants RNPm sont des mécanismes capables de moduler la fonction d'ARNm au cours d'un stress. Des modifications rapides et réversibles des protéines permettent l'adaptation au stress sans synthétiser de nouvelles protéines. De plus chaque ARNm est lié à de multiples protéines capables d'interagir avec d'autres protéines. Par exemple, la protéine G3BP qui a un domaine de dimérisation contribue à la formation des granules de stress (Tourrière et al., 2003). FMRP, FXR1P et FXR2P présentent aussi la capacité d'auto-agrégées (Sjekloća et al., 2009, Sjekloća et al., 2011). Ces interactions protéine-protéine favorisent l'agrégation secondaire des RNPm, et ainsi l'assemblage des GS visibles au microscope.

La microscopie a montré que l'assemblage des GS commence par la formation de nombreuses petites GS, qui fusionnent progressivement dans des structures plus grandes (Kedersha et al., 2000). De nombreux composants des GS (par exemple TIA-1 et TIAR (Kedersah et al., 1999), HuR (Gallouzi et al., 2000), FAST (Li et al., 2004), SRC3 (Yu et al., 2007) sont majoritairement nucléaires, dont la contribution à l'assemblage des GS nécessite l'exportation vers le cytoplasme.

Étape 4 : Intégration et signalisation

Certaines protéines qui n'ont pas de propriétés de liaison à l'ARNm sont recrutées dans les GS, par interactions protéine-protéine avec les protéines de nucléation des GS ou avec des composants du complexe 48S. Par exemple plusieurs protéines de liaison à TIA-1, comme (SRC3, FAST, PMR1) sont recrutées aux GS d'une manière appelée «piggyback» (Yang et al., 2006 b ,Yu et al., 2007). D'autres exemples de recrutement "piggyback" sont notamment TRAF2 (lié à eIF4G), une protéine qui régule la survie cellulaire NF-kB-dépendante (Kim et al., 2005), et plakophilin 3 (lié à G3BP), une protéine qui favorise l'adhésion cellulaire (Hofmann et al., 2006). Une deuxième voie de transduction des signaux impliquée dans l'assemblage et aussi le désassemblage des GS, est l'hypophosphorylation de certaines protéines comme Grb7 qui permet sa liaison à l'ARN et réprime sa traduction. Le facteur Grb7 est recruté au GS par liaison à HuR, ce qui stabilise TIA-1 dans sa forme agrégée. (Tsai et al., 2008).

Une troisième voie de formation des GS identifiée par Ohn et al. (2008) est la modification post-traductionnelle par O-acetyl-glucosamination (O-GlcNAc) des éléments de la machinerie de traduction, entre autre des protéines ribosomales, et cela suite au traitement à l'arsénite de sodium. Cette modification post traductionnelle semble requise pour l'agrégation des protéines liées à l'ARN dans les GS. Cette même étude met l'accent sur la modification par méthylation, où la capacité de lier des groupes méthyle via le domaine Tudor et qui serait nécessaire pour la localisation des protéines dans les granules de stress (De Leeuw et al., 2007, Goulet et al., 2008), ou leurs capacités à former des granules de stress lorsqu'ils sont surexprimés (Hua et Zhou., 2004). Enfin l'acétylation affecte également la formation des GS; le mutant de la désacétylases HDAC6 affecte la formation des GS, et bien que le mécanisme moléculaire de

l'acétylation n'est pas clair, il semblerait que cela agit au niveau protéique avec notamment une interaction avec Hsp90, la tubuline et G3BP (Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1) (Kwon et al., 2007). Aussi des modifications de plusieurs facteurs impliqués dans le métabolisme de l'ubiquitine affectent la formation des granules de stress (Ohn et al., 2008).

Étape 5 : le triage d'ARNm

Les GS ont été définis principalement comme des sites d'accumulation passifs des ARNm non traduits au cours du stress. Par séquestration d'ARNm non traduits les GS pourraient protéger ces ARNm en permettant la réinitiation de la traduction lorsque les conditions environnementales s'améliorent (Kedersha et al., 1999). Des études ont contribué à reformuler le modèle de triage ARNm (Anderson et Kedersha., 2002, 2006), qui décrit les GS comme des compartiments auto-organisés dans lesquels les transcrits spécifiques sont sélectionnés pour la dégradation par des protéines déstabilisantes (ex PTT, BRF1), tandis que d'autres transcrits sont liés à des protéines de stabilisation (par exemple HuR) pour l'exportation ou le stockage. En outre, certains transcrits peuvent être relancés et reconvertis en polysomes, soit activement, par recrutement des facteurs nécessaires, ou passivement, en éludant le recrutement dans les P-bodies ou dans l'exosome.

Étape 6 : désassemblage des GS

Lors de retour aux conditions normales de culture cellulaire, les GS se désassemblent et cela est rapidement suivi par la reprise de la synthèse protéique (Mazroui et al., 2007, Tsai et al., 2008, Lian et Gallouzi., 2009). Toutefois le désassemblage complet de GS ne peut-être nécessaire pour la récupération totale de la traduction (Loschi et al., 2009).

Le processus de désassemblage des GS ne semble pas être simplement l'inverse du processus d'assemblage. Bien que certains événements semblent corrélés, comme l'état de phosphorylation de eIF2 α , d'autres sont distincts. Le désassemblage observé est comme une dissolution des GS plutôt qu'une réduction en petits foyers distincts (Kedersha et al., 2000, Anderson et Kedersha., 2002, 2008).

En principe, les GS pourraient être désassemblés par la dissociation des interactions créées lors du stress (par l'intervention des chaperons (HSP) induites par le stress et la

phosphorylation des différentes protéines de liaison à l'ARN (pour revue Buchan et Parker., 2009). Une exception les GS induits par la patéamine A qui sont irréversibles, même lorsque la drogue est éliminée de la culture cellulaire (Dang et al., 2006).

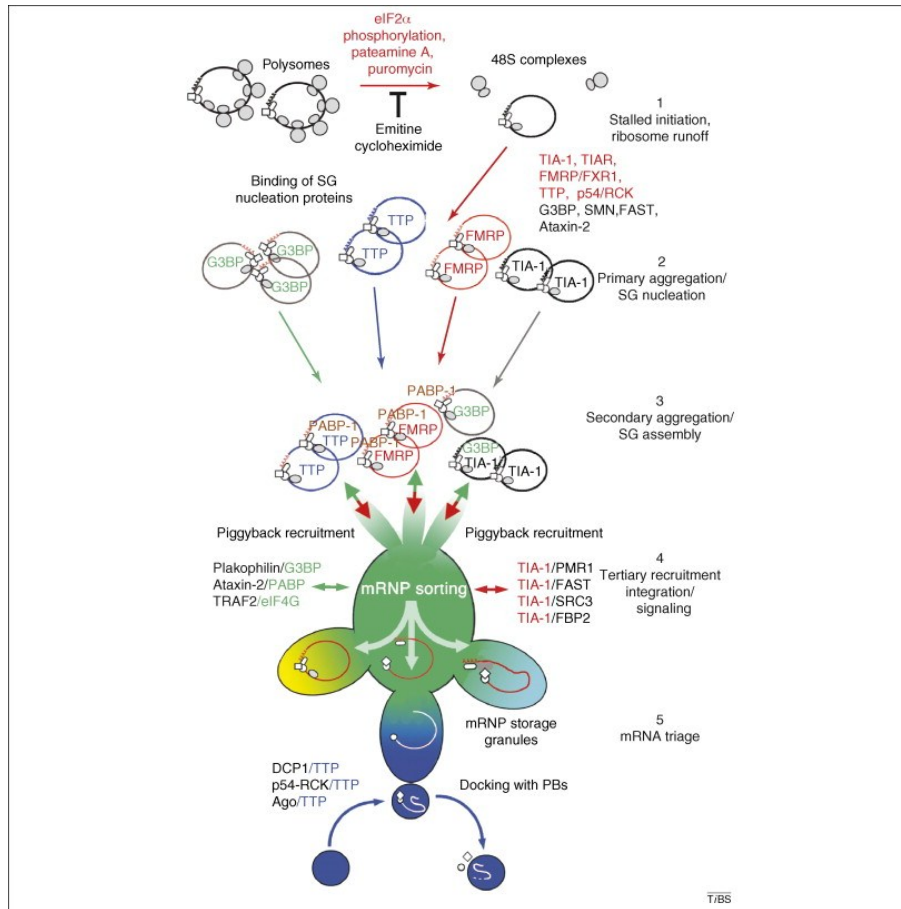


Figure I. 2 : Modèle d'assemblage des granules de stress.

Le processus d'assemblage des GS peut être divisé en différentes étapes selon la composition et la localisation de RNPm soumis à un arrêt de la traduction. (Adapté de Anderson et Kedersha, 2008)

Induction des GS indépendamment de la phosphorylation du eIF2 α

Des traitements avec des inhibiteurs de l'activité respiratoire des mitochondries, p-trifluoromethoxy-carbonyl-cyanide-phenyl hydrazone (FCCP) induit la formation des GS sans phosphorylation du facteur eIF2 α (Stoecklin et al., 2004). La carence en énergie diminue le GTP disponible et la réaction d'échange GDP/GTP par eIF2B est alors fortement défavorisée. Il y a donc moins de complexes ternaires disponibles, ce qui conduit à la formation de GS. Dans la littérature sont décrits deux petites molécules naturelles, la patéamine A (extraite d'une éponge marine) et l'hippuristanol (extrait d'un

corail) qui induisent la formation des GS par un mécanisme qui n'implique pas la phosphorylation du facteur eIF2 (Dang et al., 2006, Mazroui et al., 2006). Ces deux molécules inhibent la traduction en perturbant l'activité de l'hélicase eIF4A. Cette hélicase à ARN a une activité ATP dépendante et forme le complexe eIF4F avec eIF4G et eIF4E (Bordeleau et al., 2006, Low et al., 2005). Le complexe eIF4F est responsable du recrutement des ribosomes en permettant la liaison du complexe 43S avec l'ARNm. L'hippuristanol semble agir en inhibant la capacité d'eIF4A à se lier à l'ARN tandis que la patéamine A modifie l'affinité d'eIF4A pour ses partenaires d'interactions eIF4G et eIF4E. Dans les deux cas, le recrutement du ribosome par l'ARNm est perturbé (Bordeleau et al., 2006, Low et al., 2005). D'autres travaux ont montré que dans certaines conditions, la phosphorylation de l'eIF2 α ne déclenche pas nécessairement l'assemblage des GS. En effet, des infections virales comme celle causée par le virus du Nil occidental ou rotavirus n'induisent pas non plus la formation des GS malgré la phosphorylation de l'eIF2 α (Emara et Brinton, 2007, Montero et al., 2008).

c- Dynamique des GS

Par des expériences de photo-blanchiment et retour de fluorescence (FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching), Kedersha et al. (2000, 2005) ont montré que certaines protéines de liaison à l'ARN présents dans les GS (par exemple, TIA-1, TIAR, TTP, G3BP et PABP) transitent rapidement dans et hors les GS malgré la grande taille et la solidité apparente de ces structures, ce qui suggère un échange continu des composants avec le cytoplasme. En effet, les GS ne sont pas des dépôts stables d'ARNm non traduits, les inhibiteurs de l'initiation de la traduction tels que la puromycine, induit la formation de GS. Par contre, la cycloheximide ou l'émétine qui fixent les ribosomes sur l'ARNm en phase d'élongation de traduction les désassemblent (Kedersha et al., 2000, Mazroui et al., 2002).

d- Fonction des GS et leurs implications dans différents systèmes de régulation

Dans un premier temps, les granules de stress ont été définis comme étant des répresseurs de la traduction et cela du fait que de nombreux composants des granules de stress sont des répresseurs de la traduction, et leur formation corrèle avec une diminution globale des

protéines néo-synthétisées (Anderson et Kedersha., 2009). La séquestration d'ARNm dans ces foyers suggère que ce sont des sites de stockage des ARNm, où la traduction est réprimée. La présence dans les GS de protéines qui régulent positivement (HuR) ou négativement (G3BP, TTP) la stabilité de l'ARNm soulève la possibilité que les GS n'aient pas seulement une fonction de stockage, mais aussi de sélection des ARNm destinés à être traduits ou dirigés vers les systèmes de dégradation après la récupération (Anderson et Kedersha., 2002, Stoecklin et al., 2004).

Les granules de stress ont également été proposés pour avoir la fonction de stabilisation des ARNm. Pour une grande variété de réponse au stress, la déadenylation des ARNm, est une condition préalable à la dégradation, de ceux-ci et ce processus est largement inhibée dans les granules de stress (Laroia et al., 1999, Hilgers et al., 2006, Gowrishankar et al., 2006). Cependant, il faut souligner que chez la levure des mutations qui empêchent la formation de granules de stress n'affectent pas la stabilisation de l'ARNm au cours du stress (Buchan et al., 2008). Par ailleurs, la déadenylation est inhibée au cours du stress, même lorsque l'ARNm est piégé dans les polysomes (Hilgers et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la formation des granules de stress n'est pas requise pour la stabilisation globale des ARNm durant le stress.

e- GS et l'apoptose

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée est constituée par une série de processus qui entraînent la mort de la cellule. La formation de granules de stress semble jouer un rôle dans la décision d'entrer en apoptose lors d'un stress. Les granules de stress, qui contiennent plusieurs facteurs régulateurs de l'apoptose (tableau IV), semblent avoir un rôle protecteur (Baguet et al., 2007, Kwon et al., 2007, Eisinger-Mathason et al., 2008). La séquestration des protéines régulatrices d'apoptose dans les granules de stress peut éviter les interactions avec d'autres facteurs qui induisent l'apoptose en réponse au stress. Par exemple, différent types de stress actif MTK1 kinase, ce processus d'activation est facilité par l'interaction avec RACK1. Toutefois, au cours d'un stress modeste, à partir duquel les cellules peuvent récupérer, RACK1 est séquestré dans les granules de stress et cela par la capacité à lier la petite sous-unité ribosomal 40S. Ce processus limite l'activation de MTK1 et l'apoptose est inactivée (Arimoto et al., 2008). De même, la séquestration du récepteur associé au facteur 2 du TNF- α (TRAF2) dans les granules de

stress, via l'interaction du facteur eIF4G, diminue l'activation de NF- κ B médiée par le TNF- α , un régulateur clé de la transcription des réponses inflammatoires et de l'apoptose (Kim et al., 2005). Les Kinases (RSK2 : Ribosomal S6 kinase 2) et FAST sont deux facteurs anti-apoptotiques qui se localisent dans les granules de stress, et lient directement le domaine QN-riche de la protéine TIA-1. La présence d'un domaine dans la kinase FAST qui inhibe l'activation de la caspase-3 est annulée après la liaison à la protéine TIA-1. En résumé, le rôle des granules de stress dans le contrôle de l'apoptose pourrait être de séquestrer et de réduire les facteurs d'apoptose.

f- GS et le cytosquelette

Le cytosquelette, composé essentiellement de microtubules, microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires, est un réseau complexe de structures qui s'étendent du noyau à la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Le cytosquelette joue un rôle important dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires essentielles et semble servir comme un moyen essentiel de la transmission de signaux externes dans le noyau et participe à la régulation de la croissance cellulaire, la forme, la motilité, la disposition spatiale des organites et le transport et la localisation intracellulaire de plusieurs ARNm. Les différents réseaux composant le cytosquelette jouent un rôle important dans le métabolisme de plusieurs ARNm. En effet, différentes observations démontrent que certains polyribosomes actifs sont liés aux microfilaments (Hovland et al., 1996). De plus, plusieurs composants du cytosquelette sont impliqués dans la localisation intracellulaire de plusieurs ARNm. Le réseau de microtubules joue un rôle dans l'assemblage des granules de stress (figure I. 3). En effet, un traitement avec des drogues dépolymérisant les microtubules comme le nocodazole altère la formation des granules de stress, seulement des petits granules de stress restent encore formés et cela en plus grand nombre et variable dans leur distribution (Ivanov et al., 2003, Kwon et al., 2007, Kolobova et al., 2009, Fujimura et al., 2009, Loschi et al., 2009). Tandis qu'un traitement par la latrunculine B qui perturbe les filaments d'actine, n'a aucun effet sur la formation des GS (Ivanov et al., 2003). Kolobova et al. (2009) ont montré des changements dans la composition des GS après perturbation des microtubules : la majorité des granules contient de nombreux marqueurs typiques des GS, comme TIA1, G3BP, TIAR1, et d'autres protéines liant l'ARN, mais présente une absence d'autres protéines dont le

CCRA-1, AKAP350A, eIF2 α , HuR et CUGBP, ce qui suggère que la perte de microtubules entraîne l'assemblage asymétrique de GS, et non seulement un assemblage ralenti (Thomas et al., 2011, Kolobova et al., 2009, Fujimura et al., 2009). Après la formation des GS et durant le processus de fusion les GS sont transportés vers la région périnucléaire (figure I. 3). Cependant, après la dépolymérisation des microtubules, les GS ont été observés répartis dans toute la cellule sans aucun ordre (Nadezhdina et al., 2010). Les microtubules ne semblent pas requis pour les étapes initiales de la formation des GS, mais sont indispensables pour les étapes secondaires de fusion/agrégation, transport et réorganisation de GS.

Les protéines motrices la dynéine et la kinésine ont été observées dans les granules de stress. Les expériences de knockdown ont suggéré un rôle important dans la stimulation d'assemblage et désassemblage des granules de stress respectivement (Loschi M et al., 2009). L'inhibition ou le knockdown de la dynéine augmente également la sensibilité à la protéase des GS ce qui fournit des preuves supplémentaires pour un rôle dans la formation des granules de stress (Kwon et al., 2007, Tsai et al., 2009).

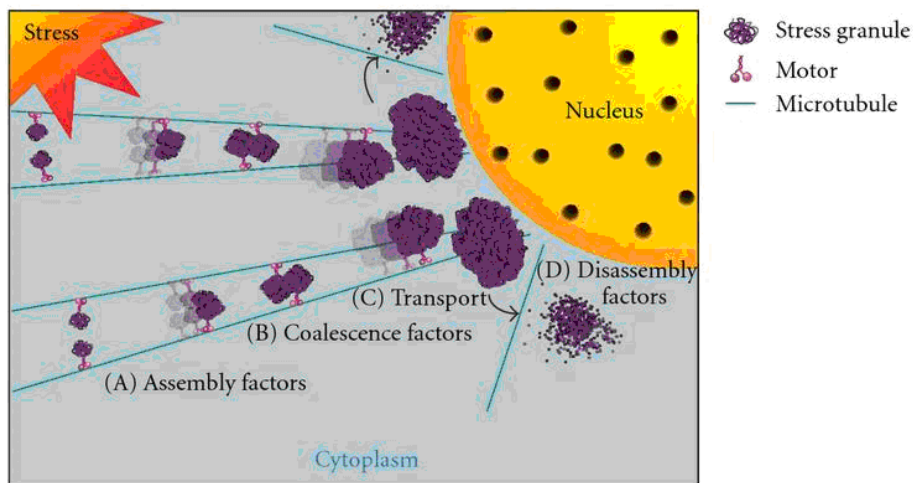


Figure I. 3 : Modèle des microtubules et des moteurs moléculaires dans la dynamique des granules de stress.

Après le stress de petits GS commencent à se former (A), transportés le long des microtubules par des moteurs moléculaires, permettant la fusion de GS dans de plus grandes granules (B). Ce processus de fusion se poursuit pendant que GS sont transportés le long des microtubules dans la région périnucléaire où les grands granules résident (C). Une fois que le stress est enlevé GS est désassemblé (D) aidé par des moteurs moléculaires ainsi que d'autres facteurs de désassemblage. (Adapté de Bartoli et al., 2011)

I- 4 Les Processing Bodies (P-bodies)

La dégradation des ARNm est un mécanisme indispensable pour la cellule chez les eucaryotes. En effet, elle permet de contrôler le niveau de base et moduler l'expression des gènes. La dégradation des ARNm permet la flexibilité cellulaire afin de changer rapidement les niveaux de transcription en réponse aux signaux environnementaux ou métaboliques. Ce contrôle est important pour les protéines, telles que les facteurs de croissance, facteurs de transcription, et les régulateurs du cycle cellulaire, qui sont actifs seulement pour des courtes périodes ou dans des conditions spécifiques (Beelman et Parker., 1995, Chen et Shyu., 1995). La dégradation des ARNm intervient aussi dans le contrôle qualité des ARNm, ce qui assure la destruction des ARNm aberrants par des voies spécialisées avant qu'ils puissent produire des protéines potentiellement nocives (Maquat et Carmichael., 2001). La dérégulation de la voie dégradation des ARNm peut conduire à des défauts graves comme la division cellulaire incontrôlée ou la transformation cancéreuse (Culbertson., 1999, Frischmeyer et Dietz., 1999). La dégradation d'ARN s'effectue principalement dans des sites cytoplasmiques spécifiques dits P-bodies pour «mRNA-Processing bodies». Les P-bodies sont des granules cytoplasmiques ribonucléoprotéiques formés entre autre des composants de la machinerie de dégradation d'ARN 5' -> 3', de la surveillance ARN et des complexes impliqués dans le silence des gènes par petits ARN.

a- Découverte et composition des P-bodies

En 1997, Bashkirov et al, ont rapporté pour la première fois que Xrn1, une exoribonucléase cytoplasmique se localise dans de petites structures granulaires hautement enrichies dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Cette observation importante est restée incomprise pendant presque cinq ans et elle a ouvert la voie à des découvertes fondamentales dans le domaine du métabolisme de l'ARN et la régulation post-transcriptionnelle. Suite à cette découverte, il a été montré une co-localisation de Xrn1 avec l'enzyme de décoiffage de la cap 5' DCP2 et ses cofacteurs dans ces foyers chez les cellules des mammifères et de la levure (Van Dijk et al., 2002, Ingelfinger et al., 2002, Lykke-Andersen., 2002, Sheth et Parker., 2003, Cougot et al., 2004). Ces foyers

sont appelés corps P, corps de DCP ou foyers de dégradation d'ARNm. (P bodies, DCP bodies or mRNA-decay foci).

Au cours des dernières années, le nombre de protéines détectées dans les P-bodies a augmenté de façon exponentielle (tableau V). En plus des protéines qui sont impliquées dans la dégradation d'ARNm incluant l'exonucléase Xrn 1, il a été décrit la présence de la désadénylase CCR4, TOB2, Pan2 et Pan3 (Sheth et Parker., 2003, Ezzeddine et al., 2007, Zheng et al., 2008), les enzymes de décoiffage de l'ARNm (DCP1 et 2) ainsi que leurs co-facteurs tels que Pat 1, hEdc3, Lsm1-7 et RCK/p54 (homologues, respectivement, de Edc3 et Dhhl chez la levure) (Scheller et al., 2007, Cougot et al., 2004, Van Dijk et al., 2002, Bashkirov et al., 1997), ainsi que d'autres composants incluant des protéines ayant des rôles en matière de surveillance ARNm (Nonsense Mediated Decay) comme SMG5-7 et UPF1-3 (Sheth et Parker ., 2006, Unterholzner et Izaurralde., 2004), d'interférence ARN et de la répression de la traduction tels que les microARN et les protéines Argonautes (Liu et al., 2005, Andrei et al., 2005, Sen et Blau., 2005, Teixeira et al., 2005, Brengues et al., 2005).

D'une part le sérum des patients atteints par la neuropathie sensitive et motrice a permis de découvrir d'autres composants des P-bodies. En plus de la protéine GW182 impliqué dans la voie des microARN, Rap55 (RNA Associated Protein of 55 KDa ou LSml4) et Ge-1 (ou RCD8 ou Hedls pour Human enhancer of decapping large subunit), toutes les deux sont impliquées dans le décoiffage des ARNm (Yang et al., 2006 a, Yu et al., 2005). D'autre part, des enzymes impliquées dans d'autres processus cellulaires liés à l'ARN, entre autre l'hélicase à ARN à motif DEAD, la Dedlp qui affectent et s'accumulent dans les P-bodies (Beckham et al., 2008), FAST impliqué dans l'épissage alternatif (Kedersha et al., 2005) et des régulateurs de la traduction comme hMex3A, CPEB (Buchet-Poyau et al., 2007, Wilczynska et al., 2005).

Il est important de noter que les protéines ribosomales ainsi que celles impliquées dans l'initiation de la traduction sont absentes des P-bodies à l'exception chez les mammifères de la cap-binding protein eucaryotic translation -initiation factor-4E (eIF4E) et son partenaire de liaison, eIF4E-transporteur (eIF4E-T), qui sont présents dans les P-bodies chez les mammifères (Andrei et al., 2005, Ferraiuolo et al., 2005).

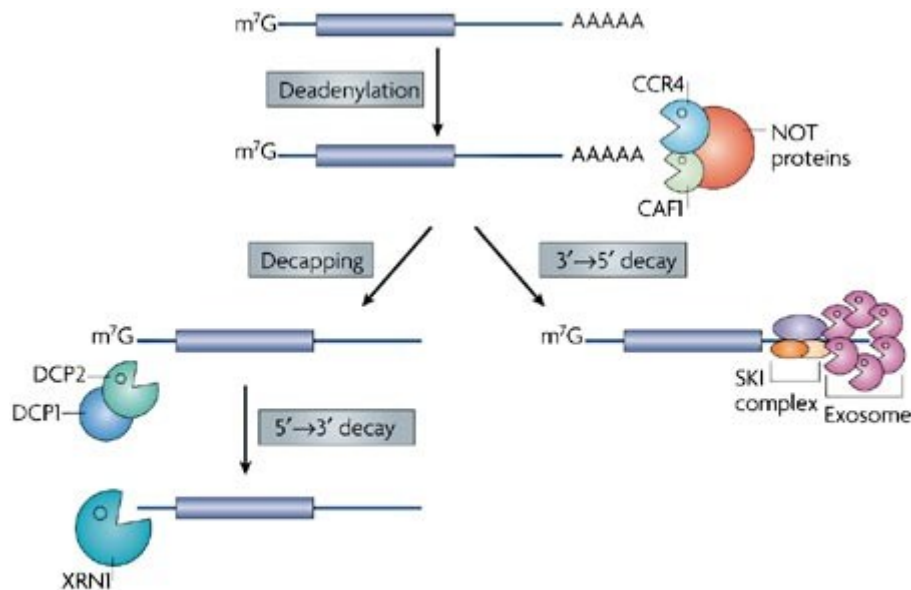
b- Fonctions des P-bodies

La composition des P-bodies suggère qu'ils sont impliqués dans de nombreux modes de régulation post-transcriptionnels et joueraient un rôle central dans la régulation de l'expression génétique.

b- 1 Les P-bodies et la dégradation d'ARNm

Dans les cellules eucaryotes, la dégradation des ARNm se fait par deux voies alternatives, qui sont toutes deux précédées par enlèvement de la queue poly (A)⁺ à l'extrémité 3' des ARNm appelée déadenylation. Par la suite l'ARNm est soit dégradé via une voie 3'→5' par un complexe exonucléolytique appelé l'exosome, lui-même régulé par le complexe SKI. (Wilusz et Wilusz., 2004, Parker et Song., 2004, Houseley et al., 2006), soit par une autre voie, qui procède par l'élimination de la coiffe du messenger par le complexe de décoiffage, composé de DCP2 associé à de nombreux cofacteurs, et l'ARNm peut alors être dégradé par Xrn1, une exonucléase à activité 5'→3' (figure I. 4). Le décoiffage d'ARNm est un processus irréversible et hautement régulé ce qui nécessite la participation de plusieurs protéines. Ces protéines sont collectivement connues comme "decapping co-activators" (Bonnerot et al., 2000, Bouveret et al., 2000, Tharun et al., 2000, Tharun et Parker., 2001, Kshirsagar et Parker., 2004, Parker et Song., 2004, Fenger-Grøn et al., 2005, Tharun et al., 2005). Toutes les protéines de la voie de dégradation de l'ARNm 5'→3' sont localisées dans les P-bodies (Bashkirov et al., 1997, Eystathioy et al., 2002, Ingelfinger et al., 2002, Lykke-Andersen et al., 2002, Van Dijk et al., 2002, Eystathioy et al., 2003, Sheth et Parker., 2003, Cougot et al., 2004, Kshirsagar et Parker., 2004, Yang et al., 2004, Andrei et al., 2005, Brengues et al., 2005, Collier et Parker., 2005, Fenger-Grøn et al., 2005, Ferraiuolo et al., 2005, Kedersha et al., 2005, Teixeira et al., 2005, Yu et al., 2005, Behm-Ansmant et al., 2006, Bloch et al., 2006, Sheth et Parker., 2006, Yang et al., 2006 a). Par contre, les composants de l'exosomes et du complexe SKI ne sont pas détectés dans P bodies (Sheth et Parker., 2003, Brengues et al., 2005), ce qui indique une certaine compartimentation du cytoplasme au niveau de la dégradation des ARNm. La présence des enzymes de dégradation d'ARNm dans les P-bodies a soulevé la question de savoir si les P-bodies représentent des sites de la dégradation de l'ARNm ou s'ils servent de sites de stockage pour ces enzymes. Plusieurs

éléments suggèrent que la dégradation de l'ARNm a lieu dans les P-bodies. Le blocage de la dégradation des ARNm lors d'une étape précoce en inhibant la déadénylation par exemple inhibe les P-bodies (Sheth and Parker., 2003, Andrei et al., 2005). Par contre, l'inhibition de cette dégradation lors d'une étape plus tardive, par inactivation de Xrn1, entraîne une augmentation du nombre et de la taille de ces foyers. Enfin, la détection d'intermédiaires de dégradation des ARNm dans les P-bodies, car le blocage de la progression de Xrn1 le long d'un ARNm par l'insertion de séquences d'ARN spécifiques ou par appauvrissant de Xrn1 conduit à l'élargissement des P-bodies en raison de l'accumulation d'intermédiaires au sein des P-bodies (Sheth et Parker., 2003, Cougot et al., 2004, Andrei et al., 2005, Teixeira et al., 2005). Collectivement, ces observations affirment que la dégradation des ARNm peut avoir lieu dans les P-bodies.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure I. 4 : Voies de dégradation des ARNm chez les eucaryotes.

La dégradation des ARNm est initiée par déadénylation suivi par digestion à l'une des deux extrémités. Dégradation de l'extrémité 3 catalysée par les exosomes et le complexe ski et la dégradation de l'extrémité 5' qui nécessite décoiffage (DCP1/2) suivi par dégradation à l'aide de XRN1. (Adapté de Eulalio et al., 2007a).

b- 2 Les P-bodies et la surveillance ARN

Dans les cellules eucaryotes, les mécanismes de surveillance ou de contrôle de qualité d'ARNm a pour but de s'assurer que seuls les ARNm sans erreur sont transcrit (Fasken et Corbett., 2005). Parmi ceux-ci, le mécanisme NMD (pour non-sense mediated decay),

reconnaît et dégrade les ARNm qui contiennent un codons d'arrêt de la traduction prématurés (PTC pour *Premature translation termination codon*), limitant ainsi la synthèse des protéines tronquées (Conti et Izaurralde., 2005, Lejeune et Maquat., 2005, Amrani et al., 2006). Le système NMD est déclenché par une terminaison prématurée de traduction, ce qui conduit à l'assemblage du complexe de surveillance. Ce complexe comprend les protéines UPF1-3, et quatre autres effecteurs NMD (SMG1 et SMG5-7) qui sont présent dans les P-bodies (Unterholzner et Izaurralde., 2004, Durand et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'assemblage du complexe NMD est lié aux P-bodies. Dès lors, on peut supposer que soit le complexe NMD amène l'ARNm à dégrader dans les P-bodies, ou que les P-bodies soient recrutés suite à l'activation du complexe, et que la formation des P-bodies soit une conséquence de la mise en place du NMD.

b- 3 Les P-bodies, gene silencing et la répression de la traduction

Petits ARN interférants (*small interfering RNA* : siRNA) et les miRNA sont deux classes de petits ARN impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle. Bien que les siRNA et les miRNA diffèrent dans leur mécanisme de biogenèse, ces fonctions régulatrices sont effectuées par des membres de la même famille de protéines Argonaute, avec lesquels ils s'associent dans le cadre de complexes RISC (*RNA-Induced Silencing*). Les protéines Argonaute favorisent la dégradation et/ou la répression de la traduction des ARNm qui sont entièrement ou partiellement complémentaire du siRNA et des miRNA. Les siRNA sont parfaitement complémentaires à leurs cibles et guide les protéines Argonaute a fin de cliver l'ARNm par l'exosome et Xrn1 dans la région qui est pariée en base avec le siRNA. Chez l'animal, les miRNA sont partiellement complémentaire à la cible et inhibe l'expression du messenger par répression de sa traduction et/ou par dégradation. Celle-ci ne se fait pas par clivage, mais en menant la cible vers la machinerie de dégradation de l'ARNm. L'action des miRNA nécessite les protéines Argonaute, GW182, DCP1/2, Xrn1 et le complexe de déadénylation CCR4-CAF1-NOT.

En plus les miARN ne jouent pas qu'un rôle de la dégradation des ARN, mais peuvent aussi réprimer la traduction de leur cible, sans affecter la stabilité de l'ARNm (Valencia-Sanchez et al., 2006). Il a été montré que la protéine GW182 joue un rôle dans la voie de répression de la traduction par les miARN (Behm-Ansmant et al., 2006). Les P-bodies semblent être également impliqués dans la répression de la traduction via d'autres

mécanismes. Car chez les eucaryotes, on trouve parmi les composants des P-bodies un certain nombre de protéines impliquées dans la répression de la traduction, telles que RCK/p54, CPEB, eIF4E-T.

c- Dynamique et mobilité des P-bodies

Les P-bodies sont des structures dynamiques et mobiles, dont la taille et le nombre varient selon les conditions physiologiques, et le cycle cellulaire (Yang et al., 2004, Lian et al., 2006). L'imagerie en temps réel a montré que les P-bodies sont des structures fortement mobiles (Kedersha et al., 2005, Aizer et al., 2008). Les protéines et les ARN composants les P-bodies entrent et sortent de manière réversible (Teixeira et al., 2005, Brengues et al., 2005, Kedersha et al., 2005, Wilczynska et al., 2005). Ces données suggèrent que les P-bodies soient des structures fortement dynamiques.

d- P-bodies et le cytosquelette

Le premier lien direct entre le cytosquelette et les P-bodies est suggéré par l'interaction des protéines constituant les microtubules Tub2p et Tub3p avec Dcp1p et Edc3p, deux composants des P-bodies (Gavin et al., 2006), de même que la présence d' α -tubuline, Tub1p, dans les P-bodies chez la levure.

Le traitement par la latrunculine B qui perturbe les filaments d'actine, inhibe la formation des P-bodies (Sweet et al., 2007), contrairement aux granules de stress dont la formation n'est pas inhibée dans ces mêmes conditions (Ivanov et al., 2003). Cela suggère que les P-bodies sont associés avec les filaments d'actine.

En mouvement les P-bodies semblent se lier aux microtubules (Aizer et al., 2008). Toutefois, la déstabilisation des microtubules, à l'aide du bénomyle, stimule la formation des P-bodies chez la levure et les mammifères, alors que le taux de la traduction et de la dégradation d'ARN reste non changé (Aizer et al., 2008, Sweet et al., 2007). On notera cependant, les P-bodies ne semblent pas affectés par le knockdown de la dynéine sous les conditions de non stress, ce qui suggère différents mécanismes d'assemblage de P-bodies sous différentes conditions cellulaires (Loschi et al., 2009).

I- 5 Les interactions GS et P-bodies

Une étude comparative des caractéristiques ultra-structurales par microscopie électronique des GS et des P-bodies, indique que les GS ont une structure moins compacte que les P-bodies qui, eux, ont une structure plus dense et plus fibrillaire (Souquere et al., 2009). En plus il y a une différence dans la composition entre les P-bodies et les granules de stress (figure I. 5), au niveau de la présence de la petite sous-unité ribosomale et des facteurs d'initiation de la traduction présents seulement dans les granules de stress (Kedersha et al., 2002), à l'exception cependant de eIF4E. Par contre, on retrouve dans les P-bodies les enzymes de décoiffage DCP1, DCP2, absents dans les granules de stress (Wilczynska et al., 2005, Kedersha et al., 2005). Ces différences indiquent que les deux structures sont fonctionnellement distinctes. Par contre plusieurs observations démontrent que les granules de stress interagissent avec les P-bodies et peuvent échanger des RNPM entre elles. D'une part, les P-bodies et les granules de stress se colocalisent partiellement et transitoirement suite à différents types de stress (Kedersha et al., 2005). Un certain nombre de composants sont toutefois partagés par ces deux structures, c'est le cas de l'hélicase RCK/p54, la protéine de régulation de traduction CPEB, eIF4E, les protéines déstabilisatrices d'ARN, TTP, BRF1 et l'ARNm (figure I. 5) (Wilczynska et al., 2005, Kedersha et al., 2005, Hoyle et al., 2007). D'autres part, la surexpression de certaines protéines de liaison à l'ARN comme, TTP, BRF1 ou CPEB favorise un rapprochement spatial et même une colocalisation partielle entre les P-bodies et les granules de stress (Wilczynska et al., 2005, Kedersha et al., 2005, Mollet et al., 2008). Ces données suggèrent donc un échange de composants au sein de ces structures. L'interaction et l'échange des composants entre les P-bodies et les granules de stress suggèrent un cycle de RNPM cytoplasmiques en équilibre (Parker et Sheth., 2007), ce qui explique la composition de protéines différentes dans le RNPM en raison d'événements de remodelage. En appuyant l'idée d'un cycle RNPM, la composition et la morphologie des granules de stress et P-bodies, à la fois dans la levure et les mammifères varie sous des contraintes différentes et des conditions expérimentales (Kedersha et al., 1999, Stoecklin et al., 2004, Serman et al., 2007, Buchan et al 2008., Grousl et al., 2009, Thomas et al., 2009). La composition des granules peut aussi varier dans le temps (Mollet et al., 2008,

Buchan et al., 2008; Kedersha et al., 2005), et peut être hétérogène (Touierre et al., 2003, Tsai et al., 2008).

Enfin, d'autres foyers RNPM comme les granules germinales ou les granules de transport neuronal apparaissent comme des compositions hybrides des granules de stress et P-bodies, suggérant un possible régulation à un stade intermédiaire dans le processus de remodelage (figure I. 5).

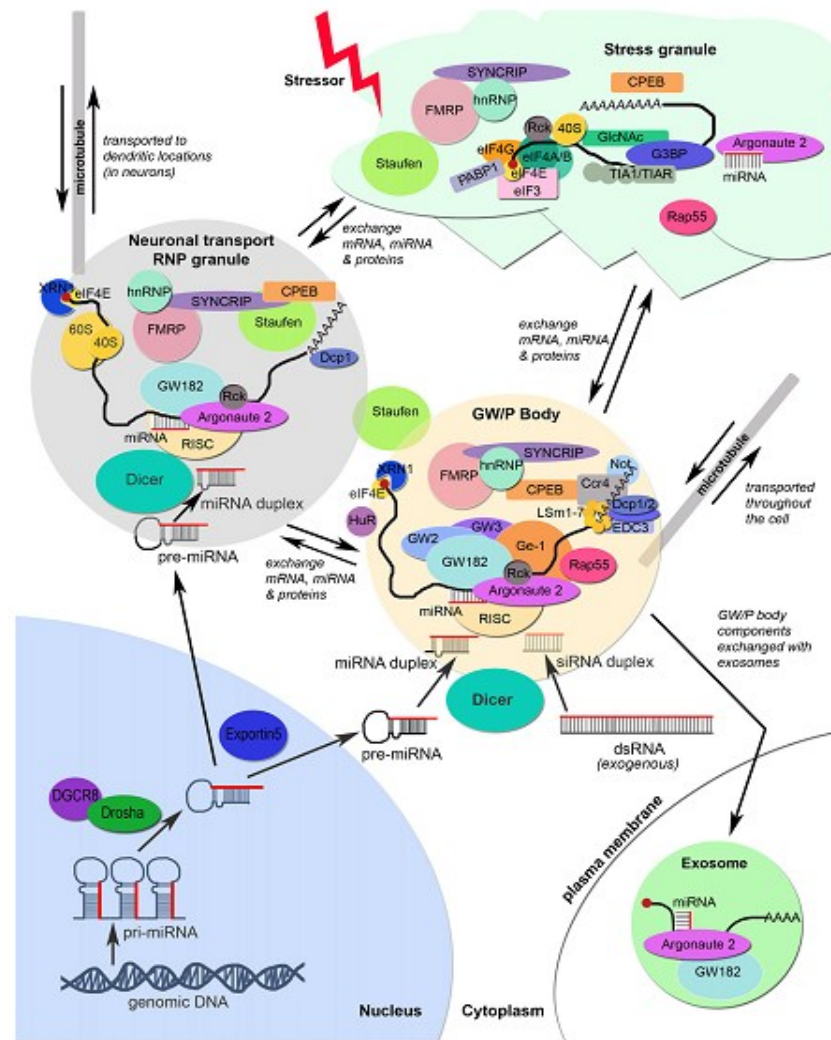


Figure I. 5 : Modèle montrant la relation entre GW/P bodies, et les granules de stress et les granules de transport neuronaux et leurs composants.
(Adapté de Moser et Fritzler, 2010).

I- 6 D'autres types de granules à ARN cytoplasmiques

a- Les granules des cellules germinales

Les cellules germinales sont des cellules souches, totipotentes, dans lesquelles se produit la méiose et qui sont nécessaires à la reproduction sexuelle et dans certains cas à la reproduction asexuelle. Les cellules germinales chez de nombreux organismes présentent des granules qui contiennent des ARN et des protéines, généralement connue sous le nom de granules germinale (Seydoux et Braun, 2006).

Ces granules sont des véhicules de transport dynamiques qui changent en taille, forme et composition à travers l'ovogenèse et l'embryogenèse précoce (Mahowald., 1963a, 1963b, 1968, 1971). Chez les animaux, les granules germinales sont présents en permanence dans les cellules germinales à l'exception de spermatozoïdes matures et sont hérités maternellement. Chez les mammifères, la composition des granules de cellules germinales est similaire aux P-bodies, ce qui indique qu'ils sont impliqués dans la dégradation des ARNm. Lin et al. (2006) proposent que ces granules germinales ont une machinerie de dégradation pré-assemblée et inactive, probablement pour faciliter leur dégradation au stade zygote. Bien peu est connu sur le sort des granules germinales pendant la division cellulaire, la ségrégation de ces granules à ARN avec la lignée germinale pourrait moduler épigénétiquement l'expression des gènes durant l'embryogenèse.

b- Les granules des cellules neuronales

Les neurones ou cellules nerveuses sont des cellules excitables, constituant l'unité de base du système nerveux. Les granules neuronales, transportent des ARNm dont la traduction a été réprimée vers les synapses et les dendrites, où ils sont libérés et traduits en réponse à des stimuli spécifiques. Dans les cellules neuronales, il a été décrit la synthèse protéique localisée aux prolongements dendritiques et synaptiques. Le modèle établie propose un transport des ARNm dans des granules neuronaux du noyau vers les prolongements neuronaux et suite à un stimulus, il y a ouverture du granule et exposition de l'ARNm à l'appareil de traduction (pour revue voir Khandjian et al., 2009).

Ces granules neuronaux contiennent plusieurs composants de granules de stress plus la grande sous-unités ribosomale.

Thomas et al., 2005 propose que Staufen 1 et Staufen 2 peuvent passer des Granules neuronaux aux GS suite à un stress dans les oligodendrocytes. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une inter-relation dynamique entre les différents types de granules à ARN.

c- Les granules UV chez la levure

L'exposition des cellules aux UV provoque des dommages importants au niveau de l'ARN chez la levure. Gaillard et Aguilera (2008) ont rapporté que chez ces organismes, les transcrits endommagés s'accumulent dans des granules spécifiques appelées granules UV (UVG : UV Granules), qui sont distincts des P-bodies, des corps EGP (eIF4E, eIF4G et Pab1-containing bodies) qui sont visibles suite à la privation en glucose dans le milieu de culture des levures, des aggresomes et des GS. Les UVG ne sont pas induits par d'autres agents stressants, ne sont pas des sites de répression d'ARNm et ils sont insensibles aux drogues stabilisant les polysomes. UVG ont pour rôle la protection des cellules contre les ARNm endommagés qui pourraient être nocifs s'ils s'engagent dans la traduction.

d- Les granules cytoplasmique antiviral

Récemment (Simpson-Holley et al., 2011) ont découvert une nouvelle classe de granule à ARN appelée granules ARN cytoplasmique antiviral (AVG : Antiviral Cytoplasmique Granules) dans les cellules de mammifères infectées par un mutant ($\Delta E3L$) du vaccinia virus. La formation de ces granules nécessite la phosphorylation du facteur eIF2 α via la kinase PKR et ils semblent être importants pour la suppression de la réplication du virus. Les AVG contiennent des ARNm et présentent une composition protéique proche des granules de stress avec notamment eIF3, G3BP, TIA-1, USP10, Caprin-1, FMRP, FXR1P, FXR2P avec absence de la grande sous unité ribosomale (60S). Les différences des AVG avec les granules de stress classiques résident dans leur stabilité vis à vis du traitement par la cycloheximide laquelle déstabilise les GS classiques. La formation de ces granules semble jouer un rôle important dans le blocage de la réplication virale.

I- 7 La protéine FMRP et GS

FMRP (pour Fragile Mental Retardation protein) est une protéine capable de lier des ARNm spécifiques et régule leur transport, leur localisation et ou leur traduction. L'absence d'expression de cette protéine est la cause du syndrome de X-Fragile, première cause génétique du retard mental héréditaire qui touche ~1:4000 males et ~1:7000 femmes dans la population générale (Khandjian et al., 2005). FMRP se localise majoritairement dans le cytoplasme, la séquence de la protéine FMRP présente un domaine NLS d'import nucléaire et un domaine NES d'export nucléaire, suggérant un transit entre le noyau et le cytoplasme (Eberhart et al., 1996, Feng et al., 1997). En plus des deux domaines NLS et NES, FMRP possède deux domaines KH et un domaine RGG décrit pour leur capacité à lier les ARN. En plus de la capacité de FMRP de lier les ARNm, Khandjian et al. (1996) ont démontré que FMRP s'associe avec les polyribosomes d'une manière dépendante de l'ARN. Cette aptitude de FMRP de lier l'ARN et son association avec les polyribosomes lui permet de jouer un rôle important dans le métabolisme, la maturation et l'épissage d'ARN (Didiot et al., 2008), la dégradation des ARNm (Zalfa et al., 2007), le contrôle de la synthèse protéique (Weiler et al., 1997, 2004, 2005), l'activation de la traduction (Bechara et al., 2009) et la répression de la traduction (Laggerbauer et al., 2001, Zhang et al., 2001b).

Dans les conditions de stress, il a été proposé par Mazroui et al., 2002 que FMRP se déplace des polyribosomes vers les GS lors d'un stress imposé, alors que la surexpression de FMRP permet d'induire l'assemblage des granules de stress. Les cellules dépourvues de FMRP affectent l'intensité des GS par cellule plutôt que leur nombre, ce qui suggère que FMRP contribuerait à l'efficacité de la formation des GS (Didiot et al., 2009).

Récemment Jeon et al. (2011) ont montré que le stress cellulaire induit une régulation positive de FMRP en favorisant la survie cellulaire par modulation des cascades de phosphorylation PI3K-Akt. La voie Ras-PI3K-Akt est l'une des voies essentielles du contrôle de survie cellulaire, l'activation de cette voie est considérée comme une caractéristique de nombreuses cellules cancéreuses (Lam et al., 2006), qui se caractérise par la dérégulation de l'apoptose et prolongement de survie. Cette découverte permet d'attribuer une nouvelle fonction pour la protéine FMRP, comme une protéine de pro-survie et ouvre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre le rôle de FMRP.

I- 8 Rayonnements Ultra-violet et leurs impacts biologiques

Ritter et Wollaston, en 1801, étaient les premiers à démontrer l'existence du rayonnement ultraviolet (UV) par son effet chimique sur des sels d'argent. Les rayons UV sont des rayonnements électromagnétiques non-ionisants qui répondent aux lois de l'optique géométrique, dont la longueur d'onde est comprise entre 400 nm (lumière visible) et 100 nm. Les UV représentent environ 8% du spectre solaire atteignant la surface terrestre. Ses rayonnements s'avèrent plus destructifs que les rayonnements visible et infrarouge du fait de leur plus grande énergie.

Les effets biologiques des UV varient selon la longueur d'onde ce qui a conduit à les séparer en 3 sous groupes : UVA (400-320 nm), UVB (320-280 nm) et UVC (280-100 nm) (Diffey., 2002).

Les UVC sont les radiations UV les plus énergétiques, ces radiations sont bloquées par la couche d'ozone et n'atteignent donc pas la surface terrestre sauf dans des hautes altitudes. Cependant l'accentuation du "trou de la couche d'ozone" dans certaines zones terrestre pourrait avoir un impact sur le passage des UVC. De ce fait, l'irradiation UVC est devenu un stress environnemental inquiétant pour la population. Les rayonnements UVC sont fréquemment utilisés pour les expérimentations biologiques du fait de leur grande énergie qui induit d'importants dommages à très faibles doses et donc des temps d'exposition très courts par rapport aux UVA et UVB.

La majeure partie des études sur les effets des UV s'est focalisée sur les dommages induits au niveau de l'ADN. En effet il a été montré que les UVC peuvent causer des dimères de pyrimidine cyclobutane et des photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone.

Les dommages sur l'ADN peuvent avoir des liens directs et indirects avec les lésions cutanées, le vieillissement, le cancer (Boukamp., 2005, Gruber et al., 2007, Sprecher., 2007, Berwick et al., 2008). Les UV peuvent représenter une cause majeure de maladies, de part l'altérations des voies de signalisation intracellulaire ainsi que la production subséquente de radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (Bender et al., 1997, Herrlich et al., 2008, pour revue Muthusamy et Piva., 2010) et cela indépendamment des lésions induites directement sur l'ADN.

Au laboratoire nous nous sommes intéressés aux liens éventuelles des rayonnements UV et le stress cellulaire.

Problématiques

Les rayonnements ultraviolets C sont les rayons solaires les plus nocifs qui atteignent la surface terrestre. Il est déjà établi que ces rayons causent des dommages cellulaires principalement sur l'ADN (pour revue Sinha et Häder., 2002), et activent toute une cascade de signalisation et des mécanismes moléculaire permettant aux cellules de faire face au stress causé par les UV.

Certaines études suggèrent que l'irradiation aux UVC à 254 nm des cellules en culture induit la formation des granules de stress (GS) (Kedersha et al., 1999, Hua et Zhou., 2004, Pothof et al., 2009). Toutefois, aucune de ces études ne montre de façon convaincante qu'il s'agit bien de GS classique. Aussi le mécanisme moléculaire à la base de la formation de ces granules suite à un stress UV reste complètement méconnu. Afin de valider ces observations, nous avons cherché à caractériser les granules cytoplasmique induits par les UVC.

Le laboratoire du professeur Khandjian s'intéresse depuis des années aux granules à ARN dans lesquels se relocalise la protéine FMRP (Mazroui et al., 2002). Pour ce fait, nous avons caractérisé les granules cytoplasmiques formés suite à une irradiations aux UVC à différentes doses et suivant des cinétique de temps différents et cela à l'aide des marqueurs des GS et des P-bodies : FMRP, FXR1P, PABP, eIF4G, RPS6, GW182, Xrn1. Une étude portant sur la recherche des mécanismes de formation des GUV et l'impact de la formation de ces GUV sur la traduction ainsi qu'une étude sur les défauts de prolifération observés suite au stress UVC a été menée lors de ce projet de recherche.

Chapitre II :

Matériel et Méthodes

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

II- 1 La culture cellulaire

Les lignées cellulaires NIH 3T3, MEF (Mouse embryonic fibroblast cell line) et HeLa (lignée cellulaire humaine provenant de métastases d'un cancer du col de l'utérus) sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) additionné de glutamax (4 mM) de Invitrogen, de Pénicilline (100 unités/ml) de Invitrogen et de Streptomycine (50 pg/ml) de Invitrogen, de sérum bovin (BS) pour une concentration finale de 10% pour les 3T3, et de sérum de bovin fœtal (FBS) pour une concentration finale de 10% pour HeLa et MEF. Les cellules sont incubées à 37°C et 5% CO₂. Les lignées cellulaires sont passées deux à trois fois par semaine en décollant les cellules avec de la trypsine (500 ng/ml).

II- 2 Le traitements des cellules

a- Irradiations des cellules aux UV et récupération

Les cellules sontensemencées sur des lamelles (VWR micro cover glass 18 mm x 18 mm) ensuite incubées à 37°C. A une confluence de 60-70%, le milieu de culture est enlevé et remplacé par 3 ml de tampon PBS1X stérile (3 mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄) par pétri de 100 mm. Les cultures sont irradiées par la suite aux UV à 254 nm à différents doses soient 6J/m², 13 J/m² et 30J/m² avec la lampe UV (Philips T UV 15W/G15 T8). Tout de suite après, du milieu de culture neuf à 37°C est rajouté et les cellules sont remises dans l'incubateur.

b- Traitement à l'arsénite de sodium

A une confluence de 60-70%, les cellulesensemencées sur des lamelles, sont incubées avec l'arsénite de sodium (AsNaO₂) à une concentration finale de 0,5 mM. La récupération (recovery) se fait par remplacement du milieu contenant l'agent stressant par un nouveau milieu de culture frais à 37°C.

c- Choc thermique

Les cellules en culture à une confluence de 60-70% sont placées dans un bain d'eau à 42°C, à différents temps. Le retour du stress se fait en remettant les cellules dans un incubateur à 37°C.

II- 3 La prolifération cellulaire

Les cellulesensemencées sur des lamelles avec repère (Electron Micorscopy Science 18 mm x 18 mm), sont irradiées aux UV à différentes doses sont incubées à 37°C. Différents temps après irradiation, les cellules sont prises en photo avec un appareil photo, Sony (DSC-S85) sur un microscope inversé en contraste de phase (Zeiss Axiovert-25). Le nombre de cellules sur chaque grille, est compté en utilisant le logiciel ImageJ version 1.44.

II- 4 L'immunofluorescence indirecte

Les cellules,ensemencées sur des lamelles (18 mm x 18 mm), une fois irradiées ou traitées a l'arsénite de sodium sont incubées à 37°C. Différents temps après traitement comme indiqué dans les résultats, les cellules sont lavées deux fois avec le PBS 1X froid, puis sont fixées et perméabilisées pendant 10 minutes à -20°C dans une solution de méthanol/acétone (3:7) ou fixées par paraformaldehyde 1% (PFA1%) durant 15 min ensuite perméabilisées dans une solution de Triton 0,2% durant 10 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite séchées à l'air libre dans le premier type de fixation ou conservées dans du PBS1X pour le deuxième type de fixation.

Après réhydratation dans du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant une heure à 37°C avec du PBS 1X contenant 5% d'albumine bovine et Triton 0.1% afin de bloquer les sites non spécifiques. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 5% d'albumine bovine et Triton 0.1% (se référer au tableau I pour les caractéristiques et dilutions des anticorps) pendant une heure à 37°C. Les cellules sont lavées trois fois pendant 10 min avec du PBS IX-Tween 0.1 %, pour être ensuite incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent approprié : Alexa 488 ou Alexa 594 (Invitrogen) dilués dans du PBS contenant 5% d'albumine bovine et Triton 0.1%,

pendant 45 min dans l'obscurité. Les préparations sont ensuite lavées trois fois pendant 20 min.

Pour la double immunofluorescence, les cellules sont incubées avec un deuxième anticorps primaire en suivant les mêmes étapes citées ci-dessus.

Pour colorer l'ADN, les cellules ont été mises en contact avec le DAPI (Dihydrochlorure de 4',6-diamidino-2-phenylindole, 1 :5000, dilué dans le tampon PBS) pendant 1 min, rincées deux fois avec du PBS1X. Finalement, les lamelles sont montées sur lames avec le milieu de montage Fluorescent Mounting Medium (Dako).

Tableau I : Caractéristiques des anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte

Protéine	Anticorps Primaire	Provenance	Dilution	Anticorps secondaire
FMRP	mAbIC3	Lab Khandjian	1 : 2	Alexa Fluor GAM 488
FXR1P	ML13	Lab Khandjian	1 : 500	Alexa Fluor GAR 594
PABP	PABP1 Ab #4992	Cell signaling	1 : 500	Alexa Fluor GAR 594
Petite sous unité ribosomale S6	S6 mAb #2217	Cell signaling	1 : 500	Alexa Fluor GAR 594
eIF4G	eIF4G Ab #2498	Cell signaling	1 : 500	Alexa Fluor GAR 594
Xrn1	Xrn1 pAb ab70259	Abcam	1 : 500	Alexa Fluor GAR 594
GW182	Serum 18033	Lab Marvin Fritzler	1 : 500	Alexa Fluor GAH 594
β Tubuline	E7	Developmental Studies Hybridoma Bank	1 : 500	Alexa Fluor GAM 488

II- 5 L'hybridation avec polydT

Avant hybridation les cellules sont fixées avec du PFA4% durant 15min à température ambiante suivi par perméabilisation durant 15min avec 0.2% Triton. Ensuite les cellules sont pré-hybridées dans une solution 50% PBS-T/50% solution d'hybridation (50% formamide, 5X SSC, 1 mM tampon phosphate pH 7.4, 1X solution Denhardt's et 160 ng/µl ADN de sperme de saumon dénaturé) dans une chambre humide à 42°C durant 15 min. Après le polydT est ajouté à la solution d'hybridation suivi par incubation des cellules durant une nuit à 42°C sous agitation. Après hybridation, les cellules ont été traitées pour immunofluorescence comme décrit ci-dessus.

II- 6 Le «CELL GHOST »

Les cellules, ensemencées sur des lamelles, sont placées sur glace, lavées deux fois au PBS 1X et immédiatement incubées 10 min en présence d'un tampon d'extraction (20 mM Tris HCl pH 7,4, 1,25 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 1mM DTT, 5 U/ml RNasine, une mini pastille/10 ml d'Antiprotéases, 50 µg/ml Cycloheximide) en agitant délicatement sur glace. La fraction cellulaire non solubilisée lors du traitement avec le tampon de lyse est lavée trois fois pendant 5 min avec un tampon de lavage (20 mM Tris HCl pH 7,4, 1,25 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1% NP 40) toujours sous agitation sur glace. La fraction résiduelle est ensuite fixée pour les immunofluorescences, comme indiqué (II- 4).

II- 7 La microscopie

Les images sont prises en utilisant un objectif à immersion dans l'huile 60X avec un microscope Olympus AX70. Les photos sont prises avec la caméra SPOT RT Slider (Diagnostic instruments inc) et sont traitées par le logiciel Adobe Photoshop CS4.

II- 8 L'extraction des protéines et immunobuvardage

a- Extraction des protéines

Divers temps après le stress et retour du stress, les cellules 3T3 sont lavées deux fois par le PBS 1X froid ensuite les protéines sont extraites en utilisant un tampon d'extraction TEX-1X (67 mM Tris pH 8.7, 15% Glycérol, 2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 0.01%

Bromophenol). Le lysat cellulaire est ensuite traité aux ultra-sons pour fragmenter l'ADN et chauffé à 100°C pendant 6 min afin de dénaturer les protéines.

b- Coloration au bleu de Coomassie et quantification

Les protéines extraites sont déposées et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (11%) en condition dénaturante (SDS-PAGE) en appliquant un courant électrique de (82V). La migration a lieu en utilisant le tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 0,1% SDS). Les gels sont incubés dans une solution de bleu de Coomassie (0,04 % Coomassie brillant blue R, 40 % méthanol, 10 % acide acétique) pendant une heure à température ambiante sous agitation. Le gel est ensuite décoloré dans une solution de décoloration (25 % méthanol, 10 % acide Acétique) jusqu'à ce qu'il soit transparent. Les gels sont ensuite quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ version 1.44

c- Électro-transfert sur membrane de nitrocellulose

Des quantités équivalentes de protéines sont séparées par SDS-PAGE contenant 11% de polyacrylamide en condition dénaturante en appliquant un courant électrique de 30 mA par grand gel de 1,5 mm d'épaisseur dans le tampon d'électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (BioRad) dans une cuve à transfert contenant du tampon de transfert (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20% méthanol) à 100 mA pendant une nuit à 4°C.

d- Immunobuvardage

Les protéines fixées sur les membranes ainsi que le marqueur de poids moléculaire (SIGMA) sont révélés au rouge Ponceau (0,5% Ponceau (Invitrogen), 1% acide acétique). Les membranes sont ensuite bloquées pendant une heure à température ambiante, sous agitation dans le blotto contenant (PBS1X, 5% de lait en poudre). Les membranes sont incubées par la suite pendant une heure à température pièce avec les anticorps primaires appropriés dilués dans le blotto (Voir tableau II), suivi par trois lavages au PBS-Tween 0.1%. Les membranes sont incubées 1h avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (Horseradish peroxydase) DAM-HRP ou GAR-HRP (Invitrogen) dilués dans le blotto (Voir tableau II) suivi par quatre lavage pendant 10 minutes chacun avec du PBS-Tween 0.1% avant de révéler le signal par le réactif ECL

(electrochemoluminescence) plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) sur des films XAR™ (Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF).

Tableau II : Caractéristiques des anticorps utilisés en western blot

Protéine	Anticorps Primaire	Provenance	Dilution	Anticorps secondaire
Hsp70	Hsp70 SPA-812	Stressgen	1 : 15000	GAR-HRP
eIF2 alpha	eIF2 #9722	Cell signaling	1 : 1000	GAR-HRP
Phospho-eIF2alpha	eIF2 α # 9721	Cell signaling	1 : 500	GAR-HRP
Tubuline B	E7	Developmental Studies Hybridoma Bank	1 : 1000	DAM-HRP

II- 9 Le marquage au ³⁵S.

Divers temps après le stress et le retour du stress, les cellules 3T3 sont mises en présence de la ³⁵S-Meth/ ³⁵S-Cyst (Amersham) à une concentration de 150 μ Ci pendant 1 heure. Les protéines sont extraites et égalisées par la suite suivant le protocole (II-8 a et b). La révélation se fait sur des films XAR™ (Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF).

II- 10 L'analyse des polyribosomes sur gradient de sucrose.

Les cellules à confluence de 70 à 80 % sont mises sur glace et lavées deux fois avec du PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite lysées avec le tampon de lyse (20 mM Tris HCl, pH 7.4, 1,25 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 1 mM DTT, 5 U/ml RNasine, une mini pastille/10 ml d'Antiprotéases, 50 μ g/ml Cycloheximide). Le lysat est raclé avec un grattoir et récolté dans un tube « Eppendorf » sur glace. L'extrait est homogénéisé avec une seringue tuberculine, puis centrifugé 15 min à 13000 rpm à 4 °C pour séparer la phase cytoplasmique des débris membranaires et des noyaux. Le surnageant est déposé sur un gradient de sucrose (15%-45 %) (Sucrose, 20 mM Tris HCl pH 7.4, 1.25 mM MgCl₂, 150 mM NaCl), puis centrifugé deux heures à 32 000 rpm (centrifugeuse Sorval et

rotor SW 41). Les extraits sont fractionnés par poussée avec du sucrose (66% + bleu de bromophénol) et la densité optique à 260 nm est lue pour tout l'échantillon.

Chapitre III :

Résultats

III- RESULTATS

III-1 Les UVC et la formation de petits granules cytoplasmiques.

L'apparition des granules de stress suite à l'exposition des cellules aux UV est controversée. Kedersha et al., 1999 ont noté pour la première fois que le stress UV fait parti des stress chimiques et physiques qui sont capables d'induire la formation des granules de stress dans les cellules mammifères. Une décennie plus tard, Pothof et al., (2009) ont montré dans des cellules HeLa que la formation des GS suite au traitement UV est cycle-cellulaire dépendante. Cette étude montre par le marqueur TIA 1 que seules les cellules irradiées durant la phase G2 forment des GS en phase G1 suivante dans le cycle cellulaire. Chez la levure, Gaillard et Aguilera., (2008) montrent que les UV induisent la formation d'une nouvelle classe de granules à ARN en concluant qu'il ne s'agit ni de GS, ni de P-bodies.

Suite à ces différentes publications assez contradictoires, nous avons cherché à caractériser les granules induits par les UV. Pour cela, j'ai irradié la lignée cellulaire 3T3 aux UVC à 254 nm à des doses croissantes et la lignée HeLa à 13J/m². Les cellules sont ensuite fixées à différents temps après l'irradiation suivi par des expériences d'immunofluorescences par différents anticorps dirigés contre les marqueurs des GS ou des P-bodies. Tout d'abord en suivant la localisation de la protéine FMRP, une protéine bien caractérisée et étudiée au laboratoire, nous observons une relocalisation de FMRP dans des structures cytoplasmiques types granules après irradiation aux UV (GUV) ou exposition à l'arsénite de sodium (GS) plus facile à contrôler que le choc thermique. Ce dernier stress sera dans notre étude un contrôle positif de la formation de granules de stress et cela en comparaison de la localisation diffuse de FMRP dans le cytoplasme dans les conditions de culture cellulaire normales. Les observations sont concordantes d'un modèle cellulaire à un autre (figure III. 1A).

Par immunofluorescence, en utilisant différents marqueurs dont FMRP, nous observons que les granules dont la formation est induite par les UVC sont en nombre plus réduits et leur taille est plus petite que ce qu'on observe suite à l'exposition à l'arsénite. En effet, le

nombre moyen de granules par cellules est significativement plus faible dans le cas du stress UV en comparaison du stress par l'arsénite de sodium (Figure III. 1B). Après irradiation aux UV nous trouvons un nombre moyen de granules deux fois moins élevé comparativement au traitement à l'arsénite de sodium dans les cellules 3T3 et HeLa.

Du point de vue de la taille moyenne de ces structures, les GUV sont 2.7 fois plus petits que les GS induits par l'arsénite de sodium dans les cellules 3T3 et 3.84 fois plus petits que dans les cellules HeLa (figure III. 1C). Les GUV présentent une taille maximale de 0.88 μm dans les 3T3 et de 0.6 μm dans les HeLa et cela 24h après l'irradiation des cellules avec une dose de 13J/m². Dans ces mêmes conditions la taille minimale est de 0.16 μm pour les deux lignées cellulaires. Après une exposition à l'arsénite de sodium au bout d'une demi-heure la taille maximale est de 2.5 μm pour les 3T3 et 2.83 μm pour les HeLa, alors que la taille minimale est de 0.28 μm pour les 3T3 et 0.36 μm pour les HeLa.

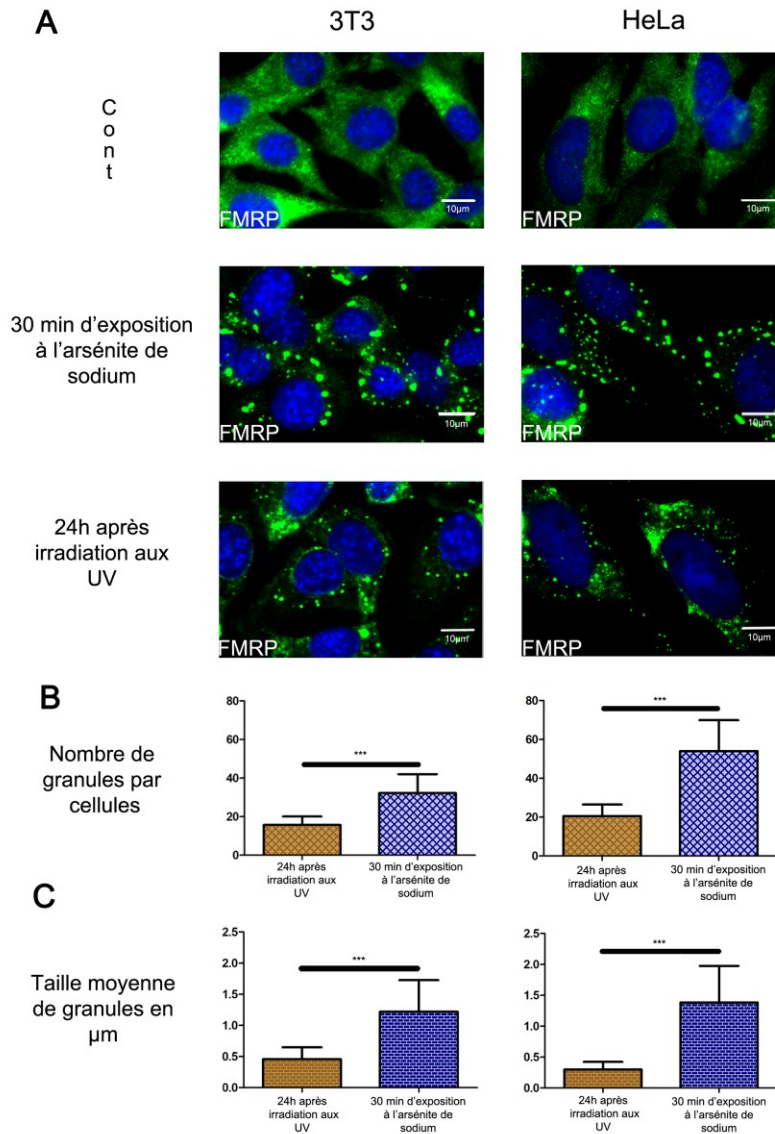


Figure III. 1 : Les UV induisent la formation de petits foyers cytoplasmiques dans les deux lignées cellulaires 3T3 et HeLa.

Les cellules ont été fixées et préparées pour le protocole d'immunofluorescence en utilisant l'anticorps 1C3 dirigé contre la protéine FMRP. (A) les cellules 3T3 et HeLa dans les conditions normales de culture cellulaire, après exposition à l'arsénite de sodium (0.5mM) pendant 30 min et 24h après irradiation par les UVC à 254 nm avec une dose de 13J/m², Bar, (10 μm). (B) Nombre moyen de granules par cellule dans les 3T3 et HeLa après irradiation au UV à 13J/m² et exposition à l'arsénite de sodium (0.5mM). (C) Taille moyenne des granules induits par UV à 13J/m² et par 0.5mM d'arsénite de sodium en μm . (***) p<0.005).

Nous avons aussi constaté que les GUV présentent une cinétique d'apparition différente des GS classiques induit par l'arsénite de sodium. La totalité des cellules vont présenter des GS dès 20 min d'exposition à l'arsénite de sodium (figure III. 2C), alors qu'il faudra un minimum de quelques heures pour voir l'apparition des GUV dans quelques cellules et 24h pour avoir près de 72% de cellules présentant des GUV à 13J/m² et cela aussi bien pour les cellules 3T3 et HeLa (figure III. 2A et B). Nous montrons que la formation des GUV est dose dépendante car seulement 19% de cellules présentent des granules à la dose de 6J/m² au point 24h, 72,3% à la dose de 13J/m² et 80,6% à la dose de 30J/m², le nombre de cellules présentant des granules augmente significativement quand la dose croit pour atteindre 93% à 50J/m² ((figure III. 2A et figure III. 3).

Pour les deux lignées cellulaires étudiées, le retour aux conditions normales est au-delà de 72h après l'irradiation. Ce phénomène de retour à l'état initial semble aussi être dose-dépendant (figure III. 2A). En ce qui concerne les GS induits par l'arsénite de sodium, ils reproduisent les résultats publiés dans la littérature (Kedersha et al., 1999). En effet, à partir de 20 min après le traitement des cellules 3T3 ou HeLa, nous observons que toutes les cellules présentent des GS, et le retour à la normale va se faire 2h après le changement du milieu contenant l'agent stressant (la levée du stress) (Figure III. 2C).

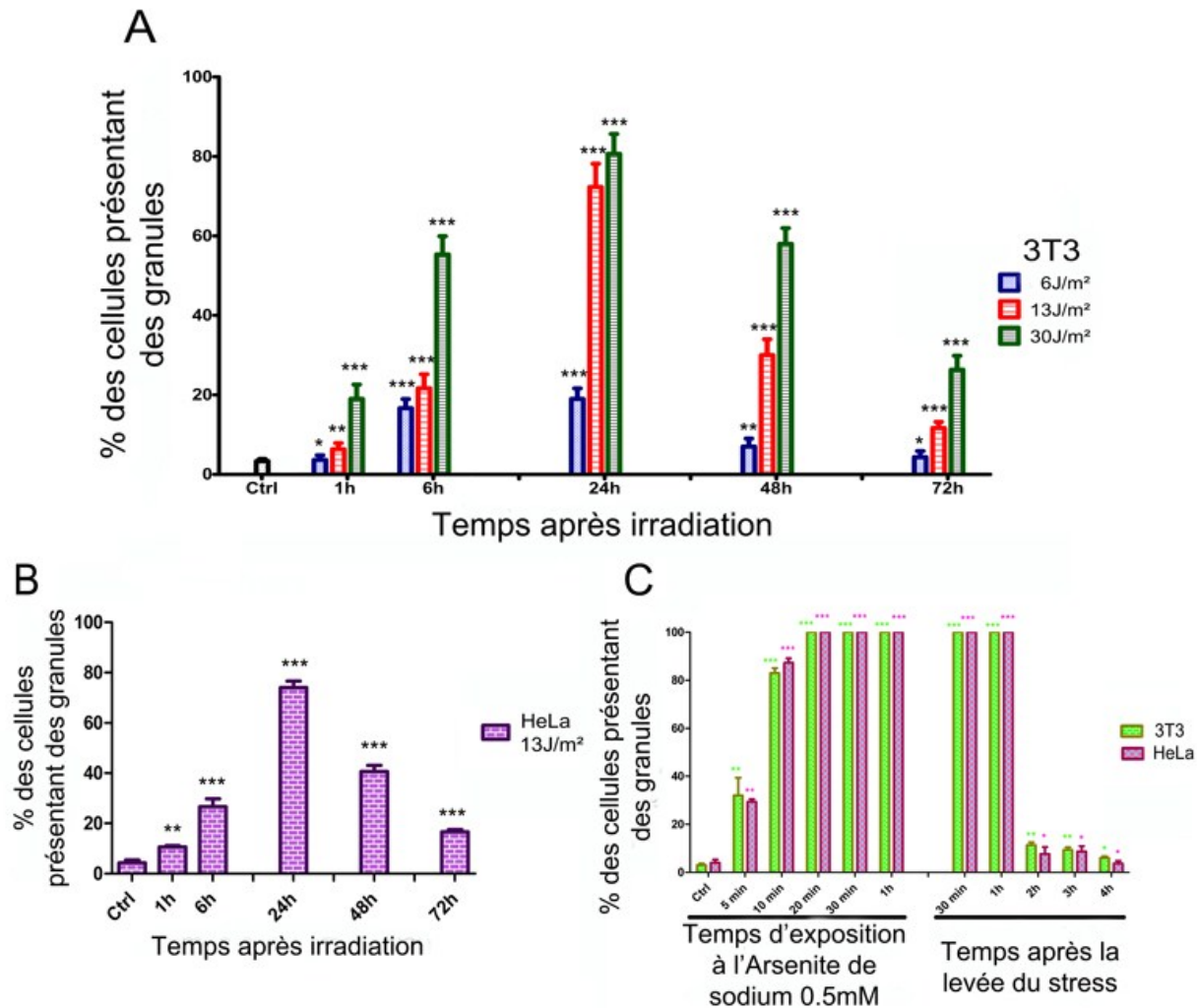


Figure III. 2 : Cinétique d'apparition des granules cytoplasmiques induits par irradiation aux UVC et par le sodium d'arsénite.

Cinétique de formation des granules cytoplasmiques suite au stress par UV et arsénite de sodium les cellules 3T3 et les cellules Hela à partir d'immunofluorescences par l'anticorps 1C3 dirigé contre FMRP. (A) irradiation des cellules 3T3 à l'UVC à 254nm à différentes doses (6J/m², 13J/m² et 30J/m²), (B) Irradiation des cellules de la lignée cellulaire HeLa au UVC à 254nm à 13J/m² et (C) traitement des cellules 3T3 et HeLa à 0.5mM d'arsénite de sodium. (*p<0.5, **p<0.05, ***p<0.005).

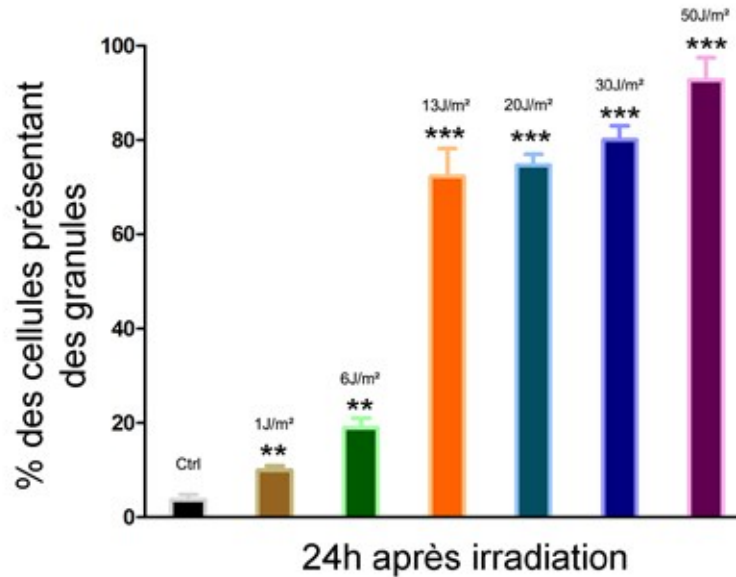


Figure III. 3 : Cinétique d'apparition des granules cytoplasmiques, 24h après l'irradiation au UVC à différentes doses chez la lignée cellulaire 3T3.

Le nombre de cellules présentant des granules a été compté 24h après l'irradiation, en préparant les cellules pour le protocole d'immunofluorescence en utilisant l'anticorps 1C3 contre FMRP. (**p<0.5, ***p<0.005).

III- 2 Effets des UV sur la viabilité et la prolifération cellulaire.

Après l'irradiation aux UVC, nous observons que les cellules ne poussent pas aussi bien que les contrôles, du fait qu'elles ne présentent pas la même confluence dans les boîtes de culture. Nous avons alors mené une étude portant sur la cinétique de prolifération par comptage de cellules sur des lamelles avec des grilles de lecture visibles sous microscope afin de compter les mêmes repères en fonction du temps (figure III. 4A).

L'irradiation des cellules 3T3 avec une dose de 6J/m² non létale induit un retard de prolifération cellulaire entre le temps T0 et T24h par rapport aux cellules non irradiées (figure III. 4B). A la dose de 13J/m² nous observons une stagnation en nombre de cellules du point T0 au point de T48h et c'est seulement après 48h qu'on observe une croissance dans le nombre de cellules pour atteindre la confluence 100% sur une surface de 0.25 mm² à 120h après irradiation (résultat non présentés), alors que la confluence est atteinte au bout de 48h pour les cellules non stressées et 72h après irradiation à 6J/m² (figure III. 4B). Au delà de la dose de 13J/m², par exemple 20 et 30 J/m² nous observons une perte de cellules importante de 26,7% et 27,8% après 24h, et 72,6% et 72,2 % après 48h. Dans

ces conditions les cellules ont des difficultés à reprendre leur prolifération (figure III. 4B). Au vu des résultats obtenus sur la cinétique de formation des UVG en fonction de la dose (figure III. 2A) et des résultats de comptage cellulaire suivant ces mêmes doses (figure III. 4B), il ressort la pertinence de traiter les cellules avec la dose de 13J/m² du fait qu'une dose inférieure a peu d'effet et une dose supérieure provoque des dommages importants engageant la viabilité cellulaire.

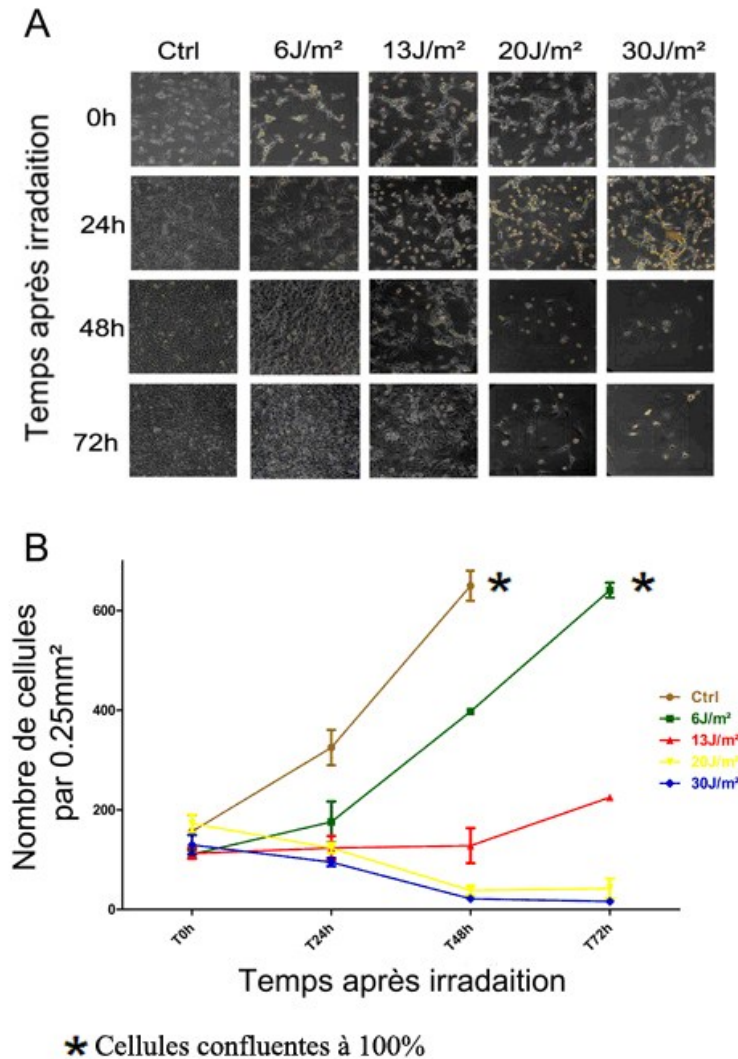


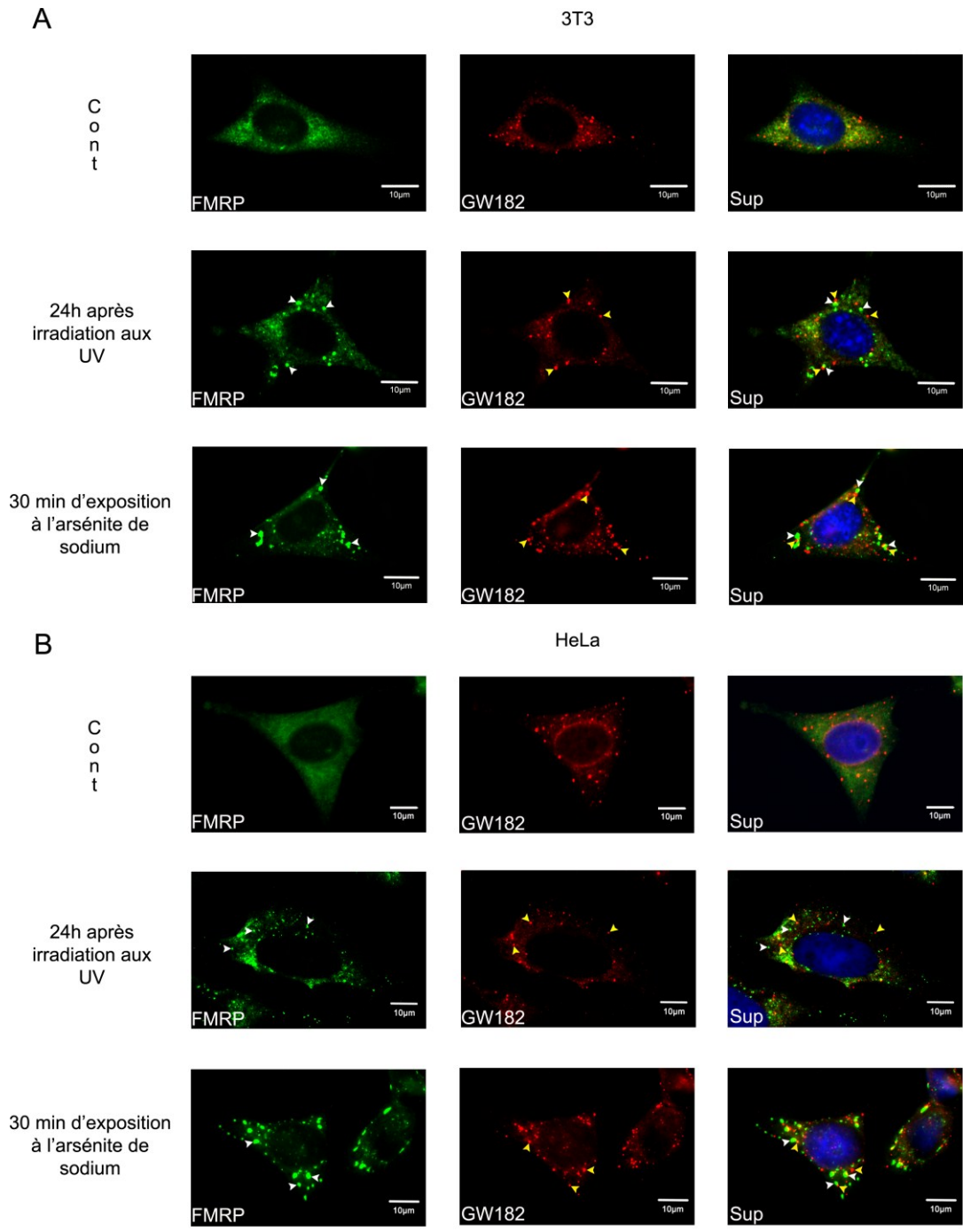
Figure III. 4 : Taux de prolifération cellulaire après traitement à différentes doses UVC dans la lignée cellulaire 3T3.

(A) Confluence des cellules ensemencées sur des lamelles avec grille sur une surface de 0.25 mm² à différents temps après irradiation. (B) Cinétiques de prolifération des cellules après irradiation à différentes doses UVC (6J/m², 13J/m², 20J/m² et 30J/m²). Le nombre de cellules sur chaque grille, a été compté en utilisant le logiciel ImageJ.

III- 3 Caractérisation des granules cytoplasmiques induits par les UV

a- Marqueurs des P-bodies

Comme nous l'avons observé (Figure III. 1C), vu la taille des GUV par rapport au GS, nous avons émis l'hypothèse que les GUV pourraient correspondre aux P-bodies et seraient ainsi un centre de dégradation des ARNm endommagés suite aux éventuelles mutations sur les séquences codantes dans l'ADN. Pour vérifier notre hypothèse de relocalisation de FMRP dans P-bodies après irradiation aux UVC, nous avons étudié par immunofluorescence la colocalisation de FMRP et les deux marqueurs spécifiques de processing bodies : l'autoantigène GW182 (Figure III. 5A et B) et l'exoribonuclease 5'-> 3' Xrn1 (Figure III. 5C et D). Dans les deux types cellulaires 3T3 et HeLa, nous n'observons aucune colocalisation de FMRP avec les marqueurs de P-bodies après stress UV. Pour le stress arsénite, nous n'observons aucune colocalisation de FMRP avec les deux marqueurs des P-bodies étudiées, en accord avec la littérature (Kedersha et al., 2005).



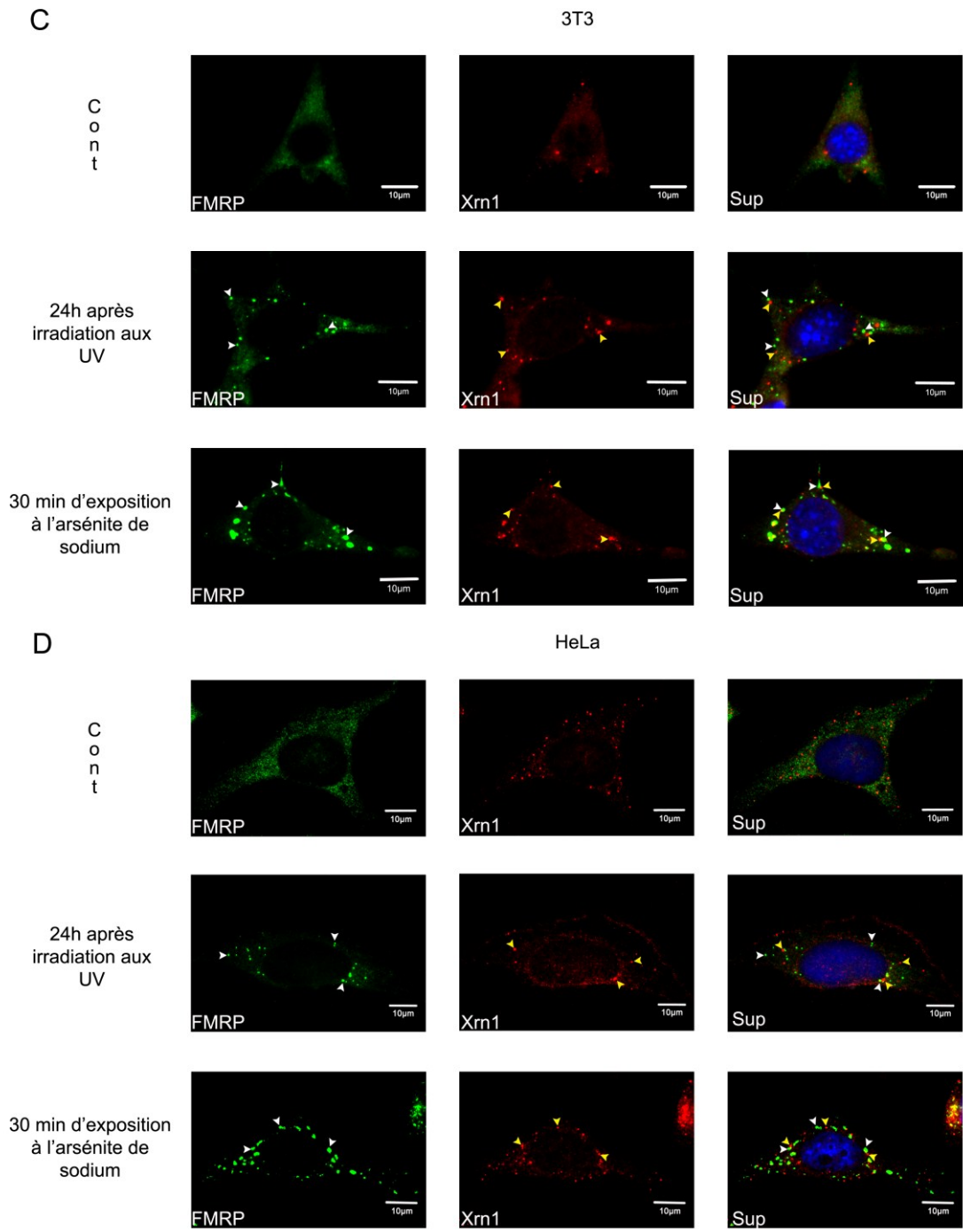


Figure III. 5 : Analyse des granules contenant FMRP et les marqueurs de processing bodies.

Les cellules totales dans les conditions normales, irradiées aux UVC 13J/m² ou exposées avec 0,5 mM d'arsénite de sodium, ont été fixées et mises en contact avec les différents anticorps pour la microscopie par immunofluorescence, FMRP et l'autoantigène GW182 (A (3T3) et B (HeLa)), FMRP et l'exoribonuclease 5'→3' Xrn1 (C (3T3) et D

(HeLa)). Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). (Flèche blanche = GUV ou GS, flèche jaune = P-bodies). Bar, (10µm).

La quantification du nombre de P-bodies dans les cellules irradiées au UV, exposées à l'arsénite de sodium et les cellules dans les conditions normales (figure III. 6), montre que l'exposition à l'arsénite de sodium induit les P-bodies car le nombre des processing bodies dans les cellules traitées à l'arsénite augmente comparativement aux cellules contrôles. Ce résultat est concordant avec la littérature (Kedersah et al., 2005). Par contre nous n'avons pas de différences significatives entre le nombre de P-bodies entre les cellules irradiées aux UV et les cellules contrôles. Ceci suggère que les UV n'induisent pas les P-bodies en comparaison avec l'arsénite de sodium.

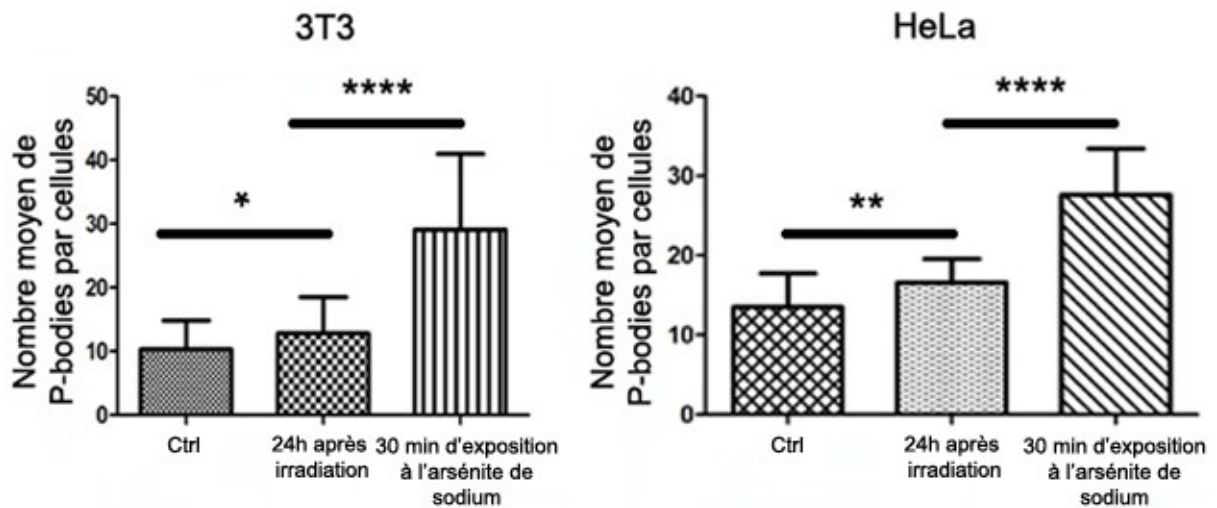


Figure III. 6 : Quantification du nombre moyen de P-bodies par cellules.

Les cellules en culture dans les conditions normales, irradiées aux UVC 13J/m² et traitées avec 0,5 mM d'arsénite de sodium, ont été fixées et mises en contact avec des anticorps contre GW182 et Xrn1 et le nombre de P-bodies par cellule été compté dans chaque condition (p* < 0.5, p** < 0.05, p**** < 0.0005).

b- Marqueurs des granules de stress

Etant donné que FMRP dans les GUV ne colocalisent pas avec les deux marqueurs de P-bodies étudiées (GW182 et Xrn1), nous avons testé la colocalisation de FMRP et son homologue FXR1P avec certains marqueurs des granules de stress à savoir PABP, la protéine de la petite sous-unité ribosomale (S6) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G. À cette fin, 24h après irradiation aux UV (13 J/m²), les cellules 3T3 et des HeLa ont été fixées et soumises à des expériences d'immunofluorescences en utilisant des anticorps spécifiques à chacun des marqueurs cités ci-dessus. Des cellules en condition normale de culture cellulaire et des cellules stressées à l'arsénite de sodium 0.5mM servant de contrôles ont été soumises au même protocole.

Le résultat obtenu montre une colocalisation de FMRP et FXR1P dans les GUV comme dans les granules de stress induits par le sodium d'arsénite (figure III. 7). La protéine de liaison à la queue poly A de l'ARNm (PABP), la protéine ribosomale (S6) et le facteur d'initiations de la traduction (eIF4G) colocalisent avec la protéine FMRP dans les granules de stress après traitement à l'arsénite de sodium, mais cette colocalisation n'est pas évidente après irradiation aux UV (figure III. 8). Cela peut être du à la petite taille de ces structures et à l'abondance de ces deux protéines dans le cytoplasme, ce qui masquerait le signal fluorescent dans les granules.

Pour résoudre ce problème, j'ai effectué une technique appelée 'Cell Ghost' (Ben-Ze'ev et al., 1979) qui permet de vider le contenu cytoplasmique et de maintenir seulement les complexes protéiques associés notamment au réseau des microtubules et par conséquent de faire ressortir le signal PABP, S6 et eIF4G au niveau des GUV si ces marqueurs sont présents. Pour cela, les cellules 3T3 et HeLa ont été traitées avec un tampon d'extraction (voir matériel et méthodes). Les immunofluorescences réalisées à partir de cellules traitées par cette technique « cell ghost : CG » montrent clairement une colocalisation de FMRP, PABP, la petite sous-unités ribosomales (S6) et eIF4G au niveau des GUV comme dans les GS (figure III. 9)

Il semblerait au vu de ces résultats que les GUV présentent les marqueurs classiques des GS (PABP, S6 et eIF4G) et absence des marqueurs de P-bodies (Gw182 et Xrn1), ce qui suggère que ces structures soient probablement des granules de stress, avec toutefois une cinétique de formation différente de celle observée après exposition à l'arsénite de

sodium ainsi qu'une taille moyenne 3 fois plus petite et un nombre moyen 2 fois moins par cellule.

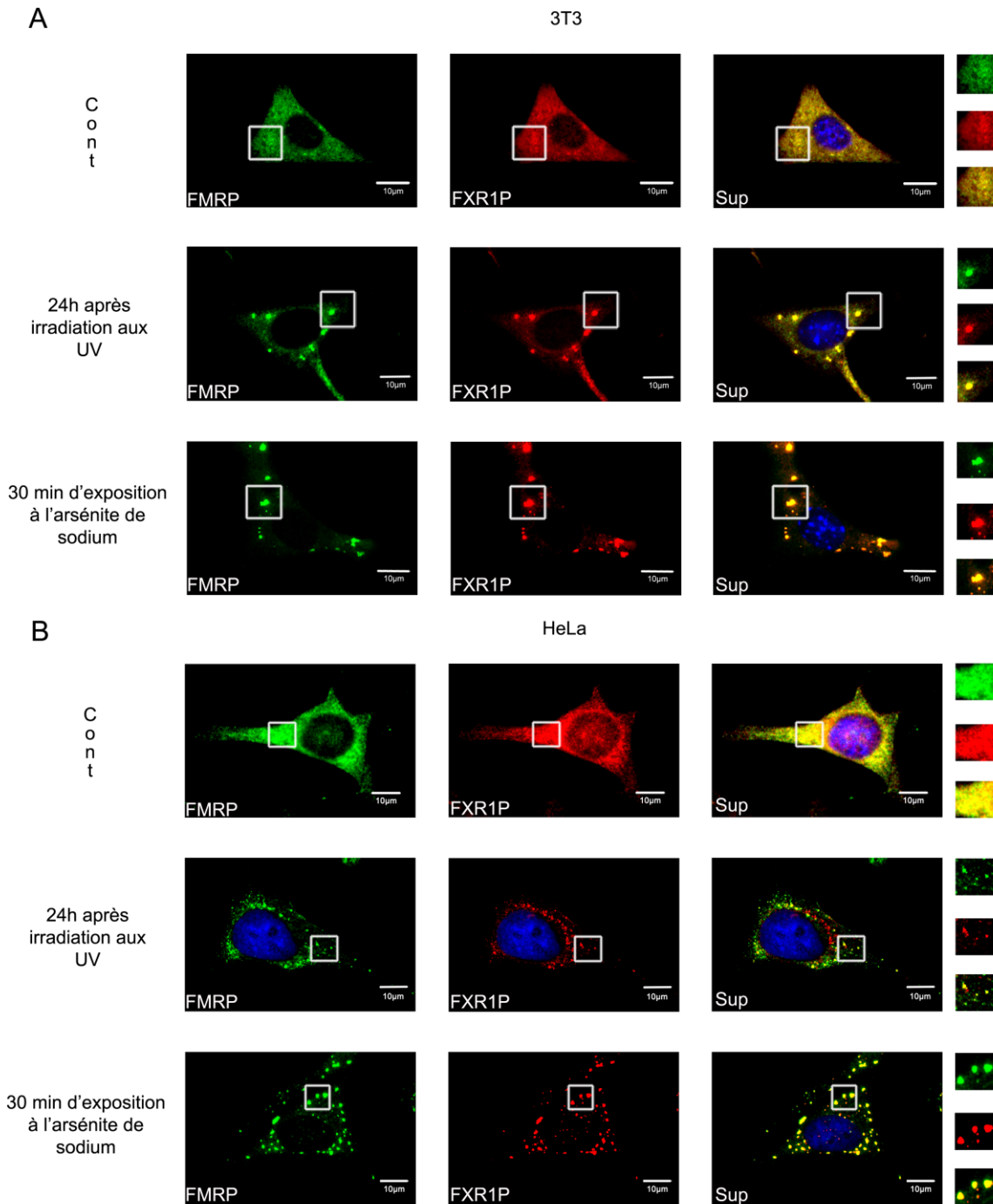
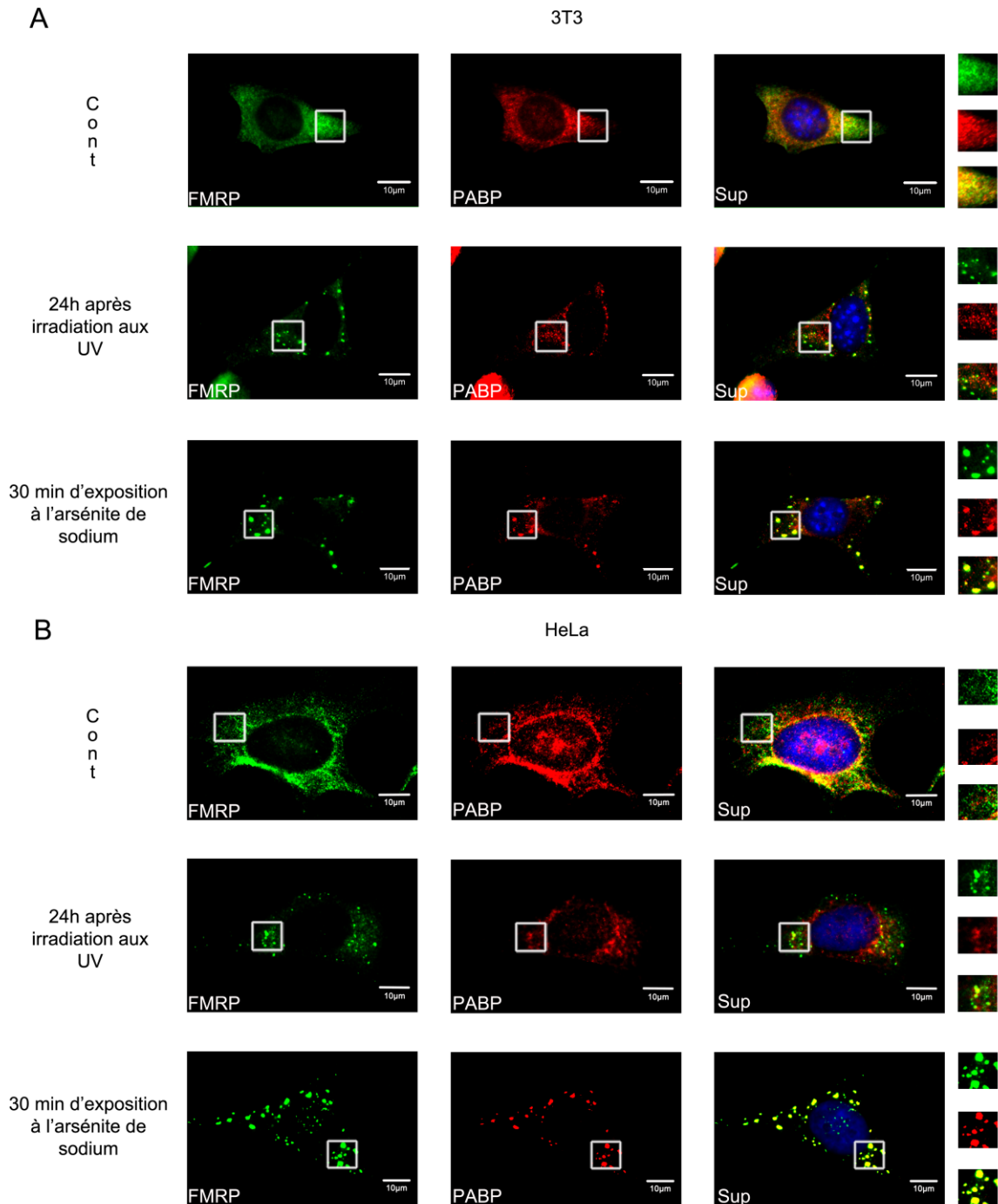
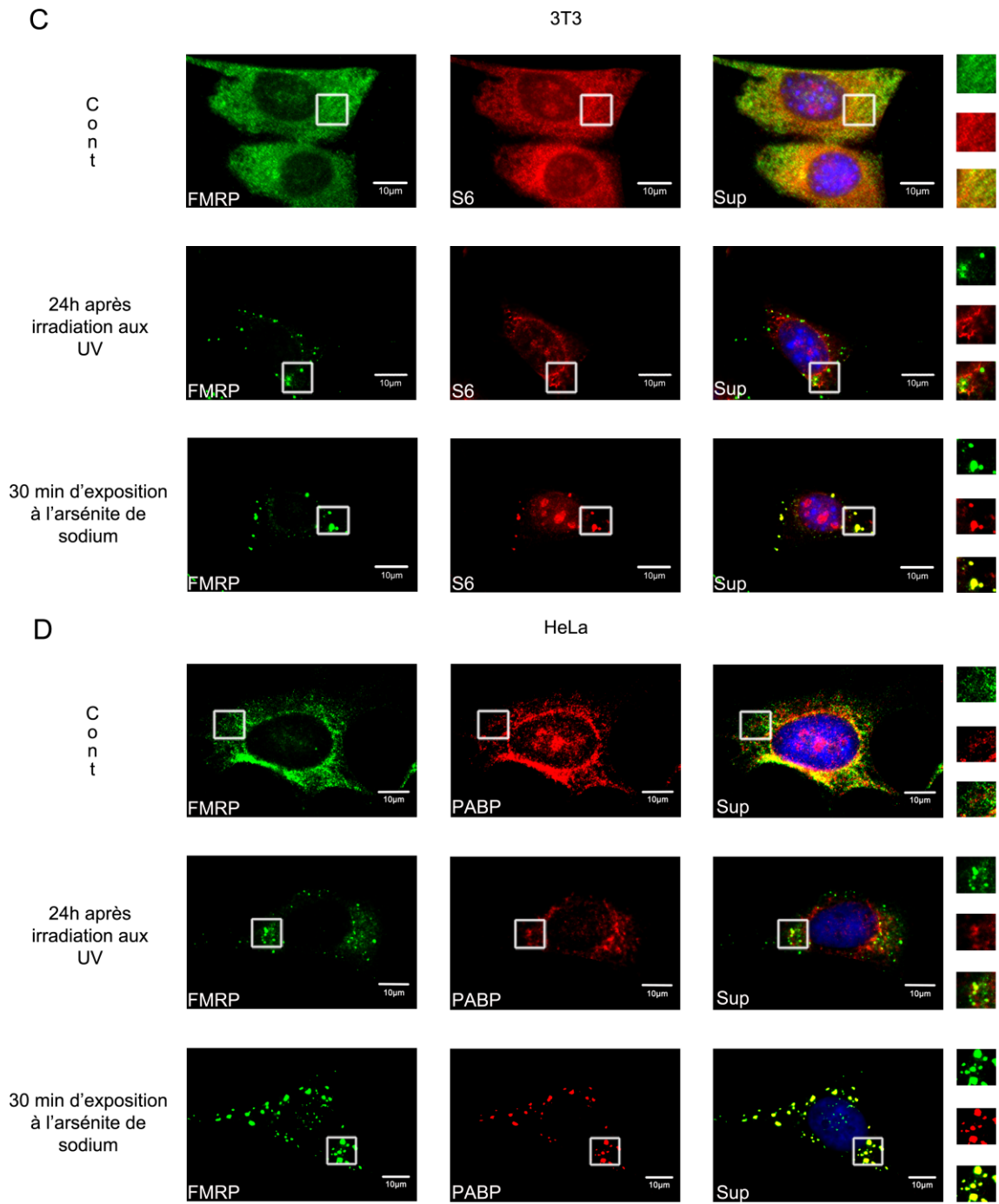


Figure III. 7 : Colocalisation de FMRP et FXR1P dans les GU et GS.

Les cellules dans les conditions normales, irradiées aux UVC 13J/m² et exposées à 0,5 mM d'arsénite de sodium, ont été fixées et mises en contact avec les anticorps 1C3 contre FMRP et ML13 contre FXR1P pour la microscopie par immunofluorescence. (A (3T3)

et B (HeLa)). Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). Les encadrés sur les photos sont présentés à droites à plus fort grossissement. Bar, (10µm).





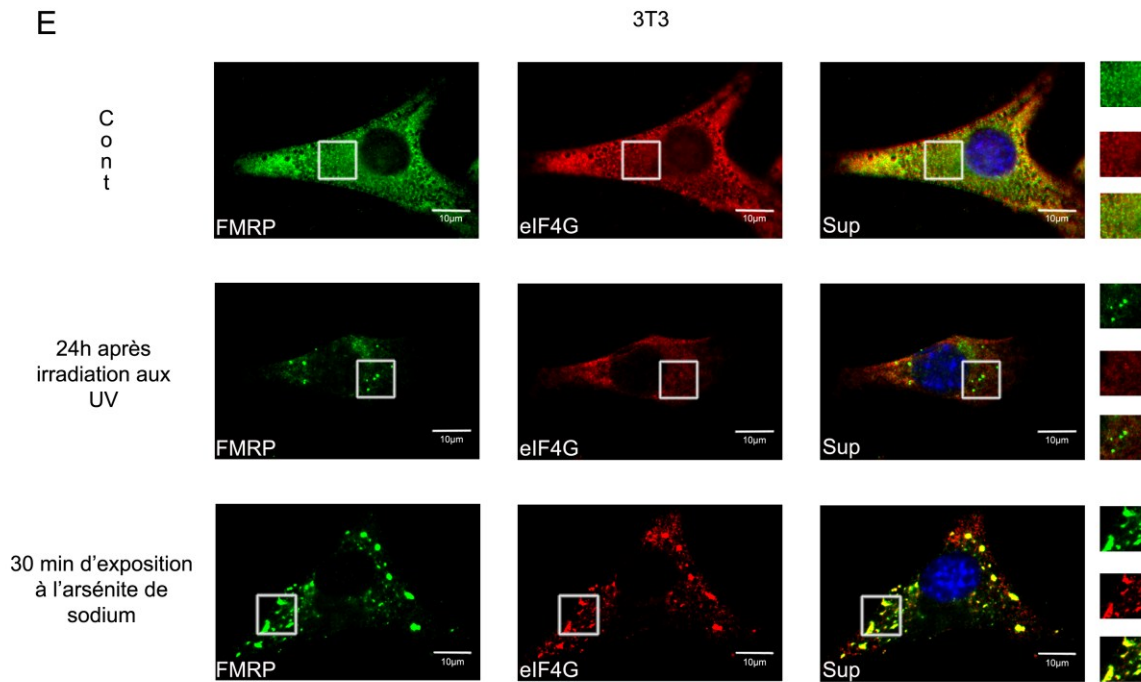
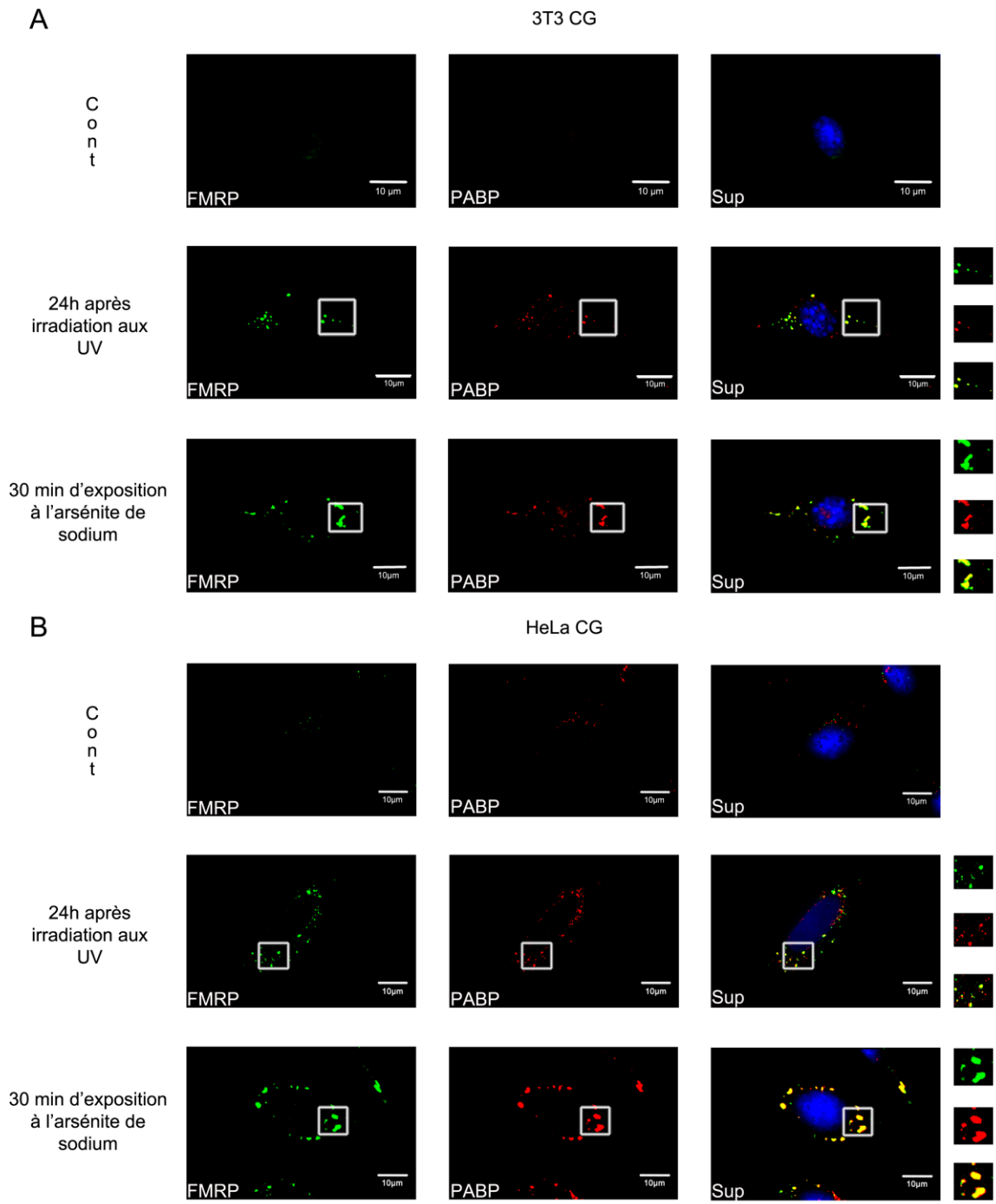
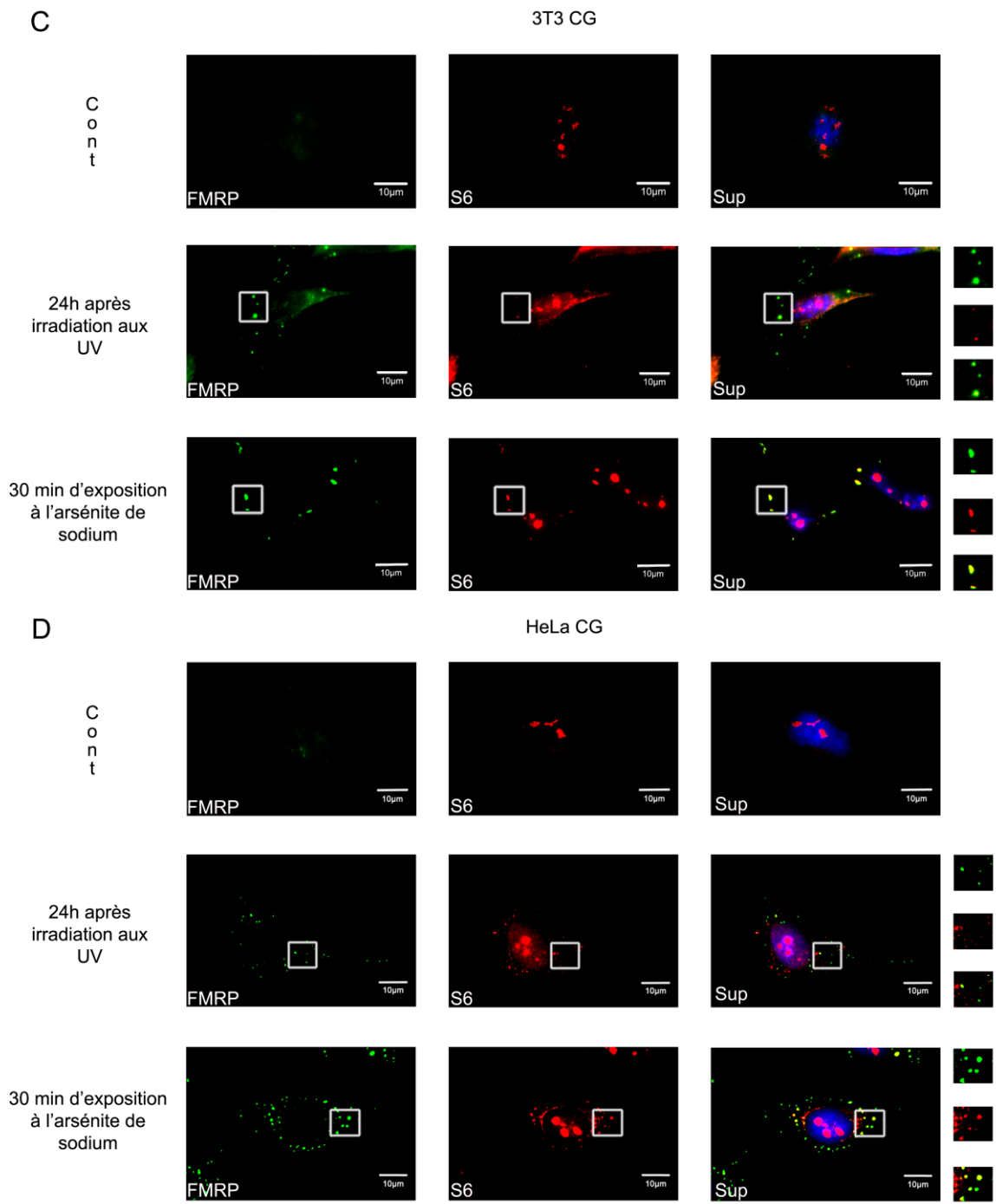


Figure III. 8 : Analyse des GUV et les par approche cellule totale.

Les cellules dans les conditions normales, irradiées aux UVC 13J/m² ou traitées avec 0,5 mM d'arsénite de sodium ont été fixées et mises en contact avec les anticorps pour la microscopie par immunofluorescence, PABP et FMRP (A (3T3) et B (HeLa)), S6 et FMRP (C (3T3) et D (HeLa)) et eIF4G et FMRP (E (3T3)). Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). Les encadrés sur les photos sont présentés à droites à plus fort grossissement. Bar, (10µm).





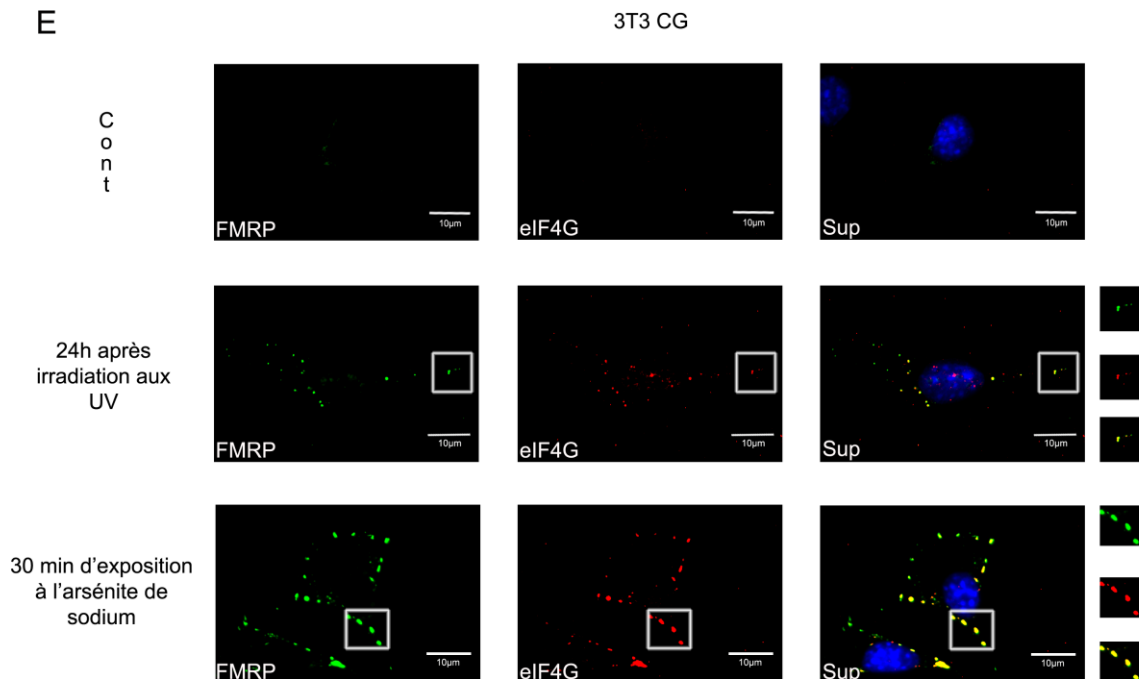


Figure III. 9 : Analyse des GUV et les GS par approche de « Cell Ghost».

Les cellules dans les conditions normales, irradiées aux UVC 13J/m² ou exposées à 0,5 mM d'arsénite de sodium, dont le contenu du cytoplasme a été vidé ont été fixées et mises en contact avec les anticorps pour la microscopie par immunofluorescence.

- A- FMRP et PABP, cellules HeLa.
- B- FMRP et PABP, cellules 3T3.
- C- FMRP et S6, cellules HeLa.
- D- FMRP et S6, cellules 3T3.
- E- FMRP et eIF4G, cellules 3T3.

Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). Les encadrés sur les photos sont présentés à droites à plus fort grossissement. Bar, (10µm).

À la lumière de ces observations, il se pourrait que les GUV soient des granules à ARN puisque les protéines présentes dans ces granules sont des protéines de liaison à l'ARN qui jouent un rôle d'une manière ou d'une autre dans le métabolisme de l'ARN, entre autre dans son transport. Suite à l'exposition aux UV, ces protéines se sont regroupées emmenant avec elles les ARN dans des granules UV. Pour confirmer ce fait, j'ai utilisé l'hybridation in situ avec une sonde oligodT pour marquer les ARN poly (A)⁺. La figure III. 10 montre qu'effectivement les GUV sont des granules à ARN comme les granules de stress induits par le sodium d'arsénite, car ils contiennent l'ARN poly (A)⁺. A la lumière de ces observations suite à l'exposition aux UV les ARNm poly (A)⁺ vont être recrutés avec des protéines de liaison à l'ARN (FMRP, FXR1P, PABP) et réprimés dans des

granules cytoplasmiques similaires aux granules de stress induits par l'arsénite de sodium.

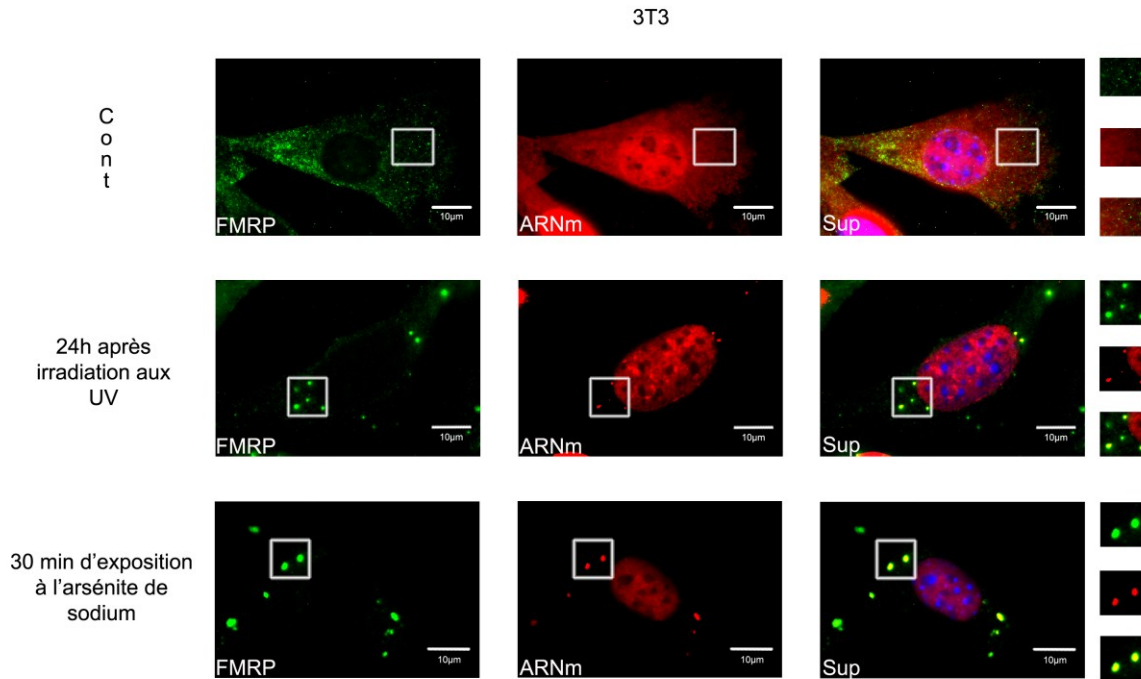


Figure III. 10 : Les granules induits par les UV contiennent de l'ARNm poly (A)⁺. Les cellules dans les conditions normales irradiées aux UVC 13J/m² et exposées à 0,5 mM d'arsénite de sodium ont été fixées pour hybridation avec l'ARN polydT et marquage avec un anticorps contre FMRP. Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). Bar, (10µm).

c- GUV et les microtubules

Les GS ont une taille comprise entre 0,2 et 5 μm (figure III. 1C) (Anderson et Kedersha., 2009, Kolobova et al., 2009, Nadezhdina et al., 2010). Cependant il a été décrit qu'une perturbation dans l'assemblage des microtubules par la colchicine ou le nocodazole a un effet sur la taille de ces granules (taille < 0,6 μm) (Kolobova et al., 2009) et une augmentation de leur nombre (Loschi et al., 2009, Kolobova et al., 2009, Fujimura et al., 2009). En effet les GS interagissent avec les microtubules via des moteurs moléculaires, et ceci est important pour l'assemblage des GS. Nous avons alors supposé que les UV pourraient avoir des effets néfastes sur la formation normale du cytosquelette et avoir de graves conséquences fonctionnelles. La persistance des granules dans les cell ghost suite à l'irradiation aux UV dont le but est d'éliminer toutes les protéines non liées à la matrice cellulaire résiduelle et donc au réseau de microtubules suggère une association de ces structures (GUV) au cytosquelette.

En utilisant la microscopie, nous avons cherché si les UVC à 13J/m² causent des perturbations au niveau du réseau de microtubules. Une immunofluorescence indirecte a été réalisée avec un anticorps spécifique à la β -tubuline et FXR1P, sur des cellules dans les conditions normales de culture, irradiées au UV et traitées au sodium d'arsénite. Nous avons du mal à interpréter l'association de microtubules avec les granules UV ou les GS à cause de l'abondance du réseau de microtubules (figure III. 11), et aucun défaut sur le réseau des microtubules n'a été détecté par cette approche.

Des études de polymérisation de microtubules sont envisageables pour répondre à cette question.

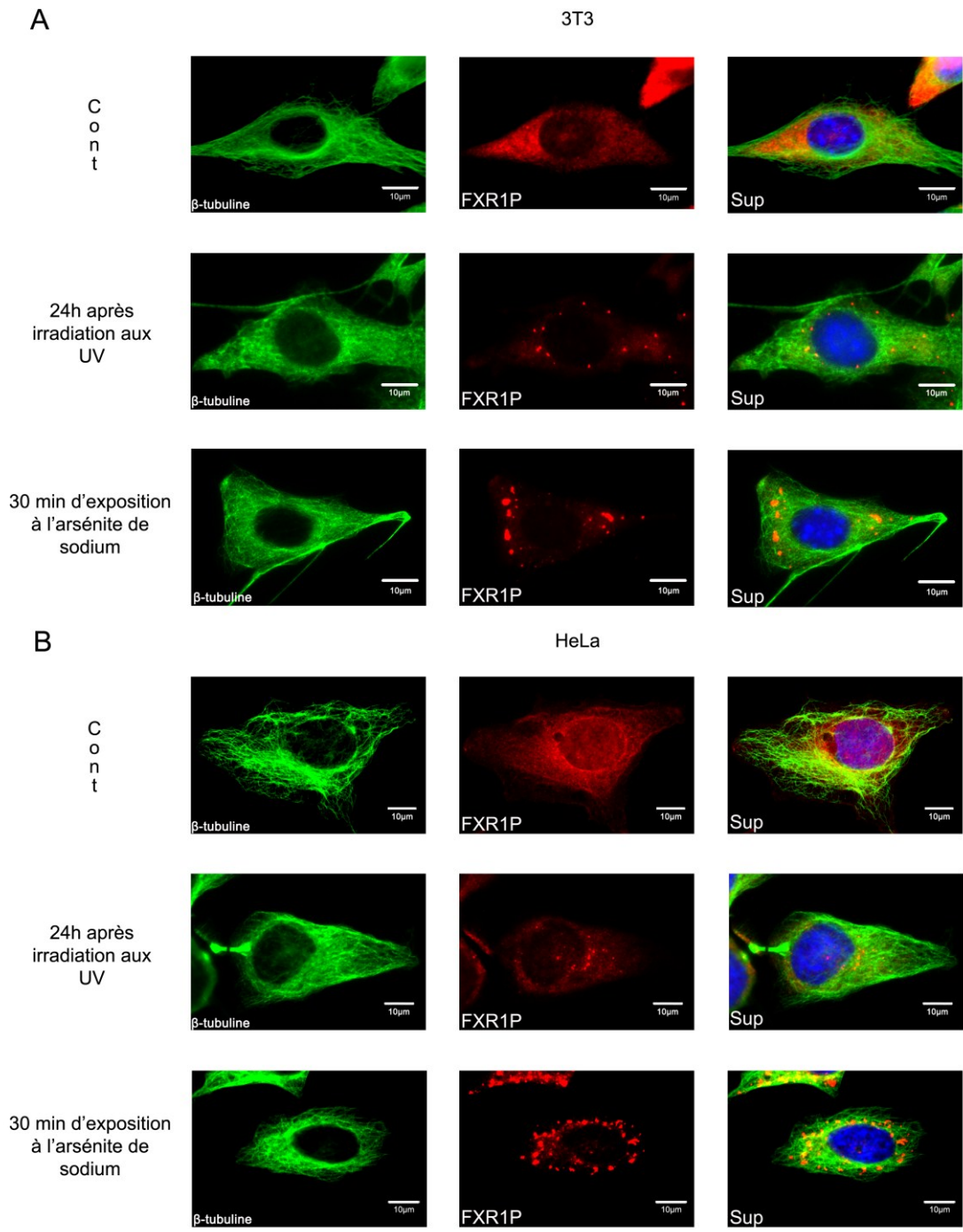


Figure III. 11 : Les granules induits par les UV sont associés aux microtubules.

Les cellules ont été irradiées aux UVC 13J/m² à 254nm ou traitées avec 0,5 mM de Sodium d'Arsénite pendant 30 min. Les cellules totales ont été fixées et mises en contact avec les anticorps contre FMRP et β -tubuline pour la microscopie par immunofluorescence. (A (3T3) et B (HeLa)). Sup = Image superposée (Vert + rouge + bleu (Dapi)). Bar, (10 μ m).

d- Effets de la cycloheximide

Différentes drogues inhibant l'élongation de la traduction comme la cycloheximide ou l'émétine induisent la dissociation des GS et celle des PB et cela vraisemblablement en bloquant le désassemblage des polyribosomes. (Kedersha et al., 2000, Mazroui et al., 2002, Cougot et al., 2004, Teixeira et al., 2005, Dang et al., 2006, Eulalio et al., 2007b, Mollet et al., 2008).

Nous avons pour ce fait tester l'effet de la cycloheximide pendant 1 heure sur les GUV après une irradiation des cellules 3T3 à 13J/m² au temps 24h. Nous remarquons une diminution significative du nombre GUV contenant FMRP par immunofluorescence suite au traitement des cellules par la cycloheximide (figure III. 12). Nous observons que 52% des cellules perdent les GUV suite au traitement par la cycloheximide. Les GUV semblent suivre la même voie de dissociation que celle établie pour les GS et P-bodies suite aux traitements par la cycloheximide.

Ce résultat démontre que ces structures sont en équilibre dynamique avec les polyribosomes donc l'ARNm peut se déplacer entre les polyribosomes et les GUV.

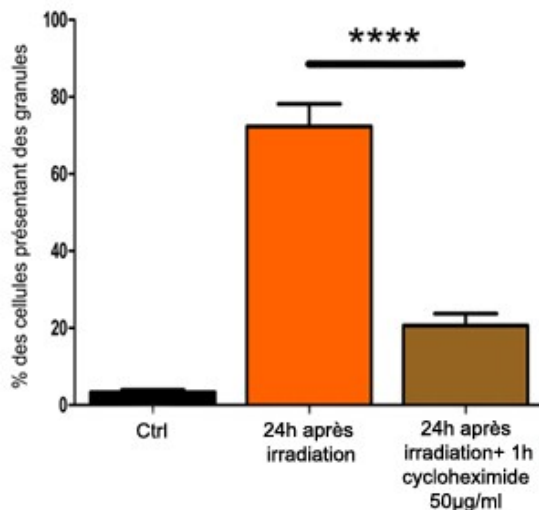


Figure III. 12 : Les granules contenant FMRP induits par les UV se dissocient après le traitement à la cycloheximide.

24h après l'irradiation aux UV les cellules ont été traitées avec 50 µg/ml de cycloheximide pendant 1h, elles ont ensuite été fixées et analysées par immunofluorescence avec des anticorps contre FMRP (**** $p \leq 0.005$).

e- Granules induits par UV et la phosphorylation du facteur eIF2 α .

La phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation eIF2 (eIF2 α) au niveau de la Serine 51 par différentes kinases semblerait être le mécanisme majeur de la formation des granules de stress (Kedersha et al., 1999). Nous avons testé les niveaux de phosphorylation de ce facteur après irradiation des cellules aux UV et lors d'un stress à l'arsénite de Sodium (Figure III. 13A). Les deux types de stress induisent la phosphorylation du facteur eIF2 α après une heure d'exposition. Pour le stress à l'arsénite de sodium, le niveau de phosphorylation du facteur eIF2 α baisse pour revenir à un niveau basal lors de la levée du stress « recovery ». En ce qui concerne le stress aux UV, à partir de 6 heures après l'irradiation, le niveau de phosphorylation revient à la normale. Suite à l'irradiation aux UV, nous avons décrit et observé qu'au point 24h, nous avons le pic de formation de GUV (figure III. 2A) et le facteur eIF2 α ne semble pas être phosphorylé en comparaison des cellules non irradiées.

La question qui découle de ces observations est la dépendance ou non de la formation des GUV de la phosphorylation du facteur eIF2 α . Pour répondre à cette question, nous avons, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Rachid Mazroui qui a un modèle cellulaire (fibroblastes embryonnaires de souris MEF) dans lequel le facteur eIF2 α est muté sur la serine 51 par une alanine (MEF-S51A), entrepris une étude par immunofluorescence pour tester la formation ou non de GUV dans ces cellules après une irradiation UV à 13J/m². Nous constatons que suite à l'irradiation aux UV, les cellules MEF (S51A) présentent autant de GUV contenant le facteur FMRP que les cellules MEF WT. Par contre ces cellules MEF (S51A) ne présentent pas de GS après un stress arsénite ce qui est attendu et en corrélation avec la littérature scientifique. (Cinétique d'apparition des GUV : figure III. 13B et les images fluorescentes : figure III. 13C). Ceci suggère que la formation des GUV est indépendante de la phosphorylation du facteur eIF2 α au niveau de la Serine 51. De ce données, nous avons aussi été intrigué par la phosphorylation du facteur eIF2 α à 1 heure et nous avons testé le profil de polyribosomes après irradiation aux UV ainsi que l'analyse du profil d'expression des protéines néosynthétisées par marquage à la méthionine ³⁵S.

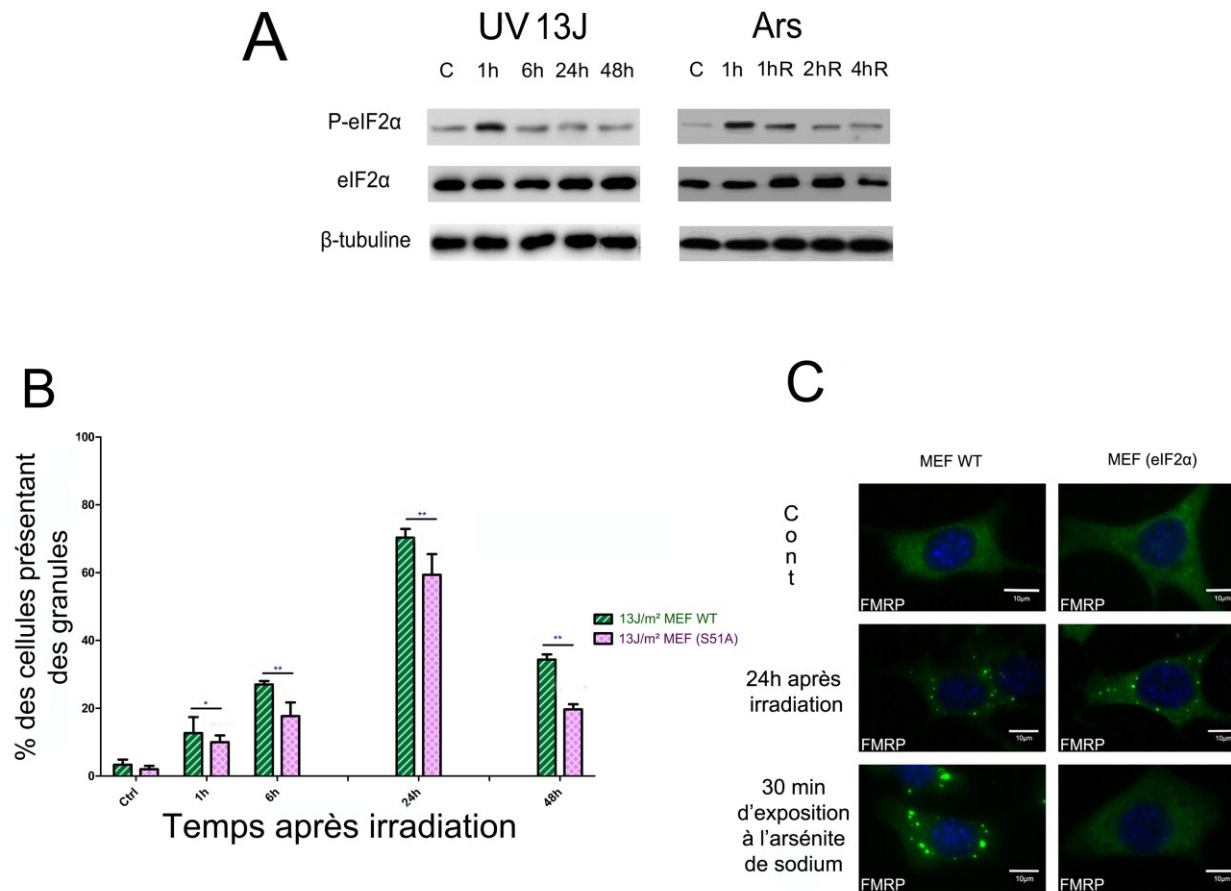


Figure III. 13 : Les granules induits par UV se forment indépendamment de la phosphorylation du facteur eIF2 α .

(A) Cinétique de la phosphorylation du facteur eIF2 α , différents temps après irradiation le niveau d'expression du facteur eIF2 α phosphorylée a été détecté par immunobuvardage. (B) Irradiation des cellules MEF WT et MEF (KO eIF2 α phosphorylée) au UVC à 254nm à 13J/m² suivi par incubation à 37°C. Le nombre de cellules présentant des granules a été compté à différents temps après les traitements. (*p < 0.05 ***p<0.005) (C) Immunofluorescence des cellules en utilisant un anticorps contre FMRP et le Dapi.

g- Irradiation aux UV et la traduction

Une heure après irradiation des cellules par les UV, nous observons en western blot une phosphorylation du facteur eIF2 α par l'anticorps anti-Serine 51 phosphorylée du facteur eIF2 α .

Nous avons supposé un possible effet sur la traduction générale et pour cela nous avons fait centrifuger sur un gradient 15-45% de sucrose des lysats cellulaires clarifiés par une première centrifugation de 15min à 12000 rpm. La répartition des polyribosomes sur ces gradients déterminés par détection aux UV. Les profils de polyribosomes à différents temps après l'irradiation UV ne montre aucune différence significative par rapport au cellules non traitées (figure III. 14), alors que le profile de polyribosomes 1 heure après expositions à l'arsénite de sodium montre une inhibition totale de la traduction (figure III. 14). Par analyse western blot en utilisant l'anticorps L7 contre la grosse sous unité ribosomale sur les différentes fractions obtenus des gradients de polyribosomes montre la présence des ribosomes (grosse sous unité ribosomale) de façon équivalente entre le stress UV et le contrôle, alors que suite à l'exposition à l'arsénite de sodium nous remarquons un déplacement vers le monosome (figure III. 14). Ceci suggère que dans le cas des UV les ribosomes sont assis sur l'ARNm de façon équivalente avec les cellules dans les conditions normales, alors que dans le cas d'arsénite de sodium les ribosome ont quitté l'ARNm, ce qui se manifeste par un arrêt global de la traduction.

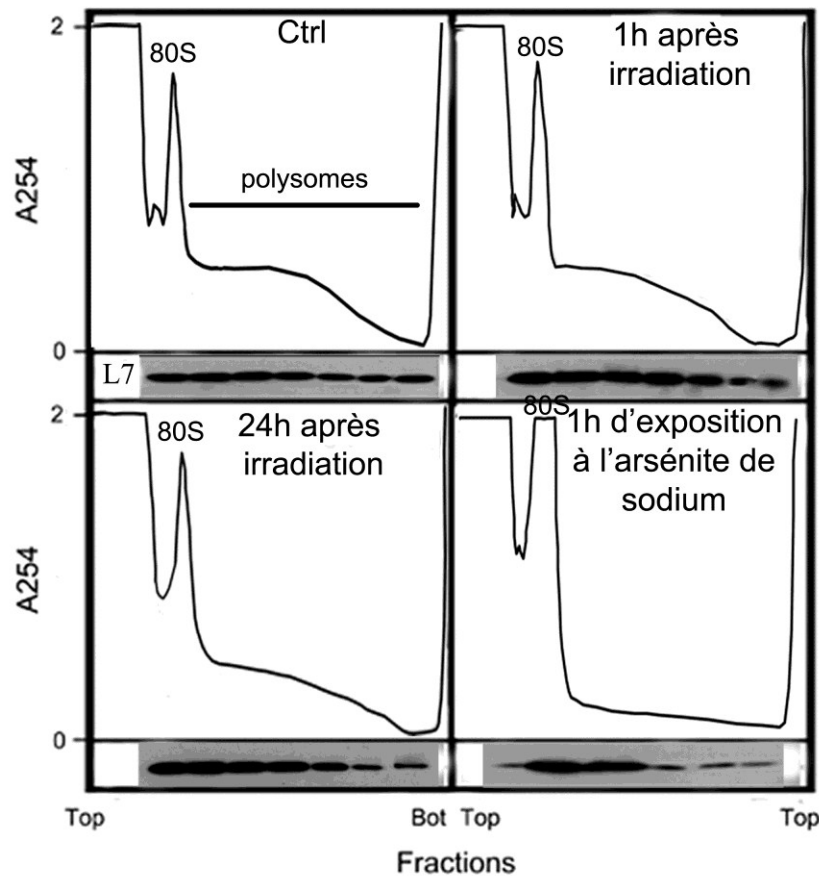


Figure III. 14 : Les UV ne causent pas un arrêt de la traduction

Les cellules 3T3 ont été irradiées aux UV ou exposées à l'arsénite de sodium; différents temps après les traitements les extraits ont été fractionnés après une séparation sur un gradient de sucrose 15-45%. Le pic 80S correspond à la localisation des monosomes. Par immunobuvardage (« Western blot ») (WB) sur la protéine de la grosse sous unité ribosomale L7 (anticorps anti-L7) afin de détecter la présence des ribosomes sur les poly.

Afin de valider le résultat de profils des polysomes et de déterminer si la synthèse protéique est active à différents temps après l'irradiation aux UV, nous avons radiomarqué les protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine ^{35}S . Nous ne remarquons aucune différence majeure entre les cellules en conditions normales et les cellules irradiées aux UV après différents temps (figure III. 15), alors qu'une heure après traitement à l'arsénite de sodium nous observons une absence de protéines néosynthétisées. 4h après la levée du stress à l'arsénite de sodium, nous observons une reprise de la synthèse des protéines avec une surexpression des certaines protéines à des poids moléculaires faisons penser aux protéines de choc thermique (HSP).

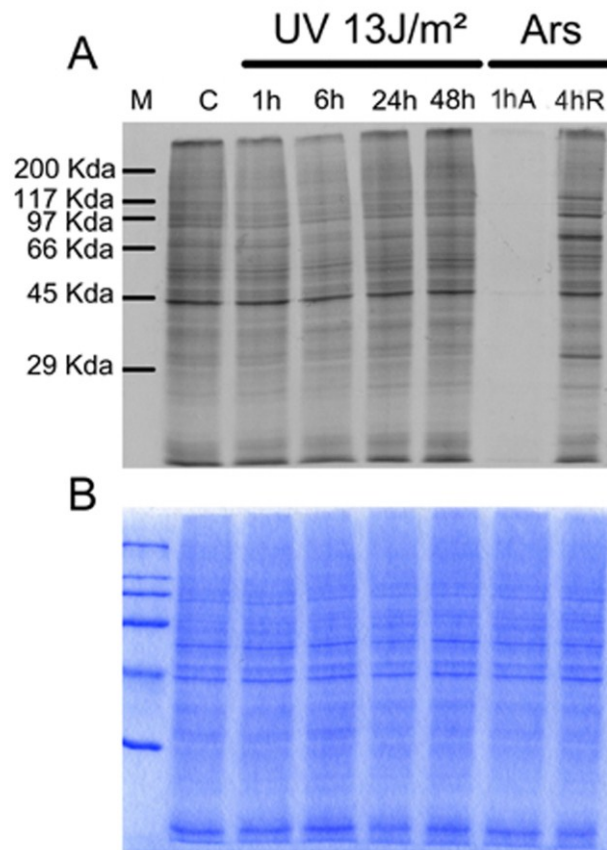


Figure III. 15 : Expression des protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine ^{35}S .

Différents temps après irradiation aux UV et exposition à l'arsénite de sodium, (A) le niveau des protéines néosynthétisées est détecté par incorporation de méthionine ^{35}S . (B) contrôle de dépôt sur gel par coloration au bleu de coomassie.

h- UV et induction de la réponse au stress (Hsp)

Par marquage de protéines neosynthétisées par la Met- ^{35}S nous avons remarqué qu'après la levée du stress suite à l'exposition des cellules à l'arsénite de sodium, nous observons une surexpression des certaines protéines à des poids moléculaires faisant penser aux HSP (figure III. 15). Pour comparer la réponse au stress par induction de la protéine HSP70, nous avons étudié par immunobuvardage le niveau d'expression de cette protéine, après irradiation aux UV à 13J/m 2 , exposition à l'arsénite de sodium et choc thermique (figure III. 16).

Le résultat obtenu montre que le stress UV à 13J/m 2 n'induit pas HSP70 au même niveau que l'exposition à l'arsénite de sodium ou le choc thermique. Ce qui suggère qu'après

irradiation aux UV les protéines ne sont pas trop affectées et cela ne nécessite pas l'action de HSP70 pour replier les protéines

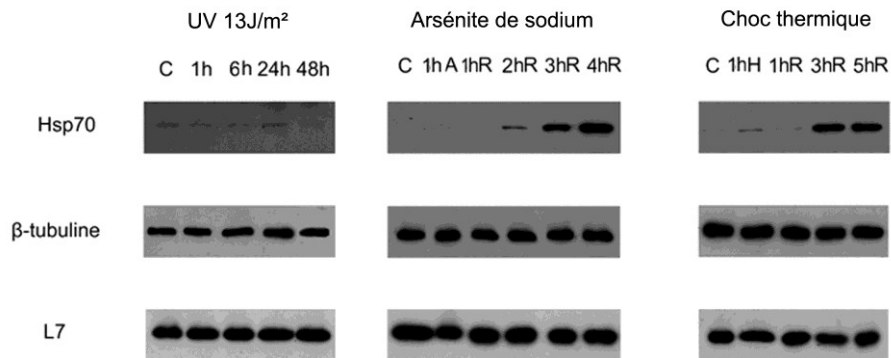


Figure III. 16 : Analyse par immunobuvardage « Western blot » des protéines exprimées par les différents types de stress.

Des quantités équivalentes de protéines extraites des cellules suivant les conditions décrites ont été séparées par SDS-PAGE et ont été soumises à une analyse western avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques au (HSP70, β-Tubuline et la protéine L7 de la grosse sous unité ribosomale).

En récapitulation, nous avons montré que l'irradiation UV induit la formation d'une nouvelle sous classe des GS. Le tableau III présente une comparaison entre les deux types de stress.

Chapitre IV :

Discussion

IV- DISCUSSION

La majeure partie des études sur les effets des UV s'est focalisée sur les dommages induits au niveau de l'ADN. Ce type de réaction concerne les photons les plus énergétiques des radiations UV. L'absorption d'énergie peut entraîner des réactions entre les bases pyrimidiques adjacentes conduisant à la formation d'une liaison covalente qui se traduit principalement par la formation des dimères cyclobutyliques de pyrimidines et des photoproduits de pyrimidine (6-4) pyrimidone conduisant à une distorsion de l'ADN ce qui bloque la transcription et la réplication par blocage des ADN et ARN polymérase. La réponse cellulaire lors d'un endommagement de l'ADN suite à l'irradiation aux UV se traduit par l'arrêt du cycle cellulaire et réparation de l'ADN ou activation des voies de la mort cellulaire lorsque les lésions sont trop élevées pour qu'elles soient réparées.

Peu d'études se sont intéressées aux effets des rayonnements UV sur le devenir des ARNm en ce qui concerne notamment leur traduction au niveau du cytoplasme. Parmi les effets des UV, il a été suggéré dans des cellules de mammifères que l'irradiation aux UV induit la formation des granules de stress (Kedersha et al., 1999). Deux autres publications ont confirmé que les cellules des mammifères irradiées par les UV présentent des granules cytoplasmiques dans lesquels se localisent SMN (Hua et Zhou., 2004) et TIA-1 (Pothof et al., 2009). En parallèle chez la levure, Gaillard et Aguilera., 2008 ont montré que les UV induisent la formation d'une nouvelle classe de granules ARN différente des GS classique, des P-bodies et des EGP-bodies.

Nous avons alors cherché à caractériser les granules induits par les UV à 254 nm dans deux types cellulaires 3T3 et HeLa et cela selon des doses différentes en suivant la localisation de la protéine FMRP.

L'irradiation aux UV, induit la formation des petits granules cytoplasmiques (GUV) qui ne sont pas des processing bodies et qui semblent être une nouvelle sous classe de granules de stress. Ces granules n'ont pas la même cinétique de formation et de disparition ainsi que la taille, le nombre et la capacité de fusion que les granules de stress classiques. D'autre part la formation de ces granules UV ne semble pas affecter le niveau de traduction, ni d'induire la réponse au stress. Toutefois, nous avons observé que

l'apparition des granules coïncide avec l'arrêt de la prolifération cellulaire. En effet, dans les conditions expérimentales utilisées, la prolifération est décalée de 24 à 48 h selon la dose d'irradiation.

L'ensemble de ces observations suggère fortement l'existence, d'une nouvelle sous classe de granules de stress induit par les UV, dont le rôle semble être la répression de la traduction des ARNm codant pour des facteurs importants de prolifération cellulaire.

Tableau III : Comparaison des granules de stress induits par UV et par l'arsénite de sodium.

	24h UV (GUV)	1h Sodium Arsénite (GS)
Pourcentage de cellules présentant des granules	72,33%	100%
Nombre moyen de granules par cellules	15,68	32,24
Taille maximal des granules en μm	0.88	2.5
Taille minimal des granules en μm	0.16	0.28
Taille moyen des granules	0.46	1,22
Induction des Processing bodies	Non	Oui
Phosphorylation du facteur eIF2 α	Non	Oui
Arrêt de la traduction	Non	Oui
Équilibre avec polysome	Oui	Oui
Induction Hsp70	-	++++++

Nous avons montré une relocalisation de FMRP dans des structures granulaires quelques heures après irradiation aux UV. De façon inattendue, il faut attendre 24h pour que l'on puisse observer un maximum de cellules présentant des granules (72% seulement des cellules présentent des granules après irradiation à 13J/m²) (figure III. 2A et B) alors 100% de cellules présentent des granules au bout de seulement 20 minutes après exposition à l'arsénite de Sodium (figure III. 2C). Ces résultats différents de ceux présentées par Pothof et al. (2009) qui ont montré que suite au traitement UV la formation des granules est cycle cellulaire dépendante. Nous avons montré que la

formation des GUV est dose dépendante car le nombre de cellules présentant des granules augmente significativement quand la dose croit (figure III. 2A et figure III. 3).

En plus de cette différence dans la cinétique de formation des GUV par rapport aux GS induit pas l'arsénite de sodium, les GUV sont moins nombreux et ont une taille plus petite que les GS classiques (voir le tableau III). Vu la petite taille des GUV nous avons émis l'hypothèse que suite à l'irradiation aux UV, les ARNm endommagés sont recrutés dans les P-bodies pour être dégradés par la suite. Une double immunofluorescence sur les cellules irradiées montre que les GUV ne sont pas des P-bodies car ils ne contiennent pas les-marqueurs GW182 (figure III. 5 A et B) et Xrn1 (figure III. 5 C et D) typiques des P-bodies. De plus l'irradiation UV n'induit pas les P-bodies par rapport à l'exposition à l'arsénite de sodium (figure III. 6). Le résultat obtenu concorde avec une étude publiée par Bollig et al., 2002 qui ont montré sur des cellules HeLa que les UV stabilisent généralement un large spectre d'ARN contenant ou pas la région ARE (AU-rich elements). En 2006 Gowrishankar et al ont montré une inhibition de la déadenylation et dégradation des ARNm suite à l'irradiation des cellules HeLa aux UV. Chez les mammifères après irradiation aux UV, les ARNm ne semblent pas être recrutés dans les P-bodies pour être dégradés par l'existence d'une réponse cellulaire permettant de stabiliser les transcrits et inhiber la déadenylation et la dégradation.

Puisque les GUV ne sont pas des P-bodies, nous avons étudié la présence de certains composants des GS dans les GUV. Les GUV contiennent l'ARNm poly (A)⁺ (figure 10), les protéines de liaisons à ARN étudiées (FMRP (figure III. 1A), FXR1P (figure III. 7) et PABP (figure III. 9A et B)), la protéine S6 de la petite sous unité ribosomale (figure III. 9C et D) et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (figure III. 9E). De plus, les GUV suivent la même voie de dissociation par la cycloheximide que les GS classiques (figure III. 12).

Pour étudier l'effet des UV sur la traduction, nous avons réalisé le profil des polyribosomes (figure III. 14) et analysé les protéines neo-synthétisées par incorporation de la méthionine ³⁵S (figure III. 15). Le résultat obtenu ne montre aucune différence au niveau de la traduction globale entre les cellules irradiées à 13J/m² et les cellules non irradiées, alors qu'après expositions à l'arsénite de sodium la traduction est inhibée totalement. À la lumière de ces résultats nous supposons qu'une petite population des

ARNm seulement vont être réprimés donc cette répression est sélective par rapport à l'exposition à l'arsénite de sodium où la répression des ARNm est globale (figure V. 1). Chez les mammifères nous montrons l'existence, d'une nouvelle sous classe de granules de stress induit par les UV, dont le rôle que nous proposons est la répression de la traduction des ARNm codant pour des facteurs importants de prolifération cellulaire. Différemment de l'étude chez la levure par Gaillard et Aguilera., 2008 qui montrent l'existence, d'une réponse cellulaire spécifique aux dommages de l'ARN chez la levure, qui mène à la stabilisation du transcrit et l'accumulation des ARN poly (A)⁺ dans des granules ARN cytoplasmiques qui ne sont pas des GS. Ils montrent, par ailleurs, que les ARN poly (A)⁺ regroupés dans ces granules sont potentiellement endommagés, ce qui suggère que ces granules feraient partie d'un mécanisme de réparation des ARN lésés. Le mécanisme de formation des GUV chez les mammifères reste inconnu, nous avons toutefois montré que ce mécanisme est indépendant de la phosphorylation du facteur eIF2 α au niveau de la serine 51 (figure III. 13B et C). La figure IV.1 présente un modèle que nous supposons pour la formation et la fonction des GUV et des GS. Les UV induisent la relocalisation et la répression de certains ARNm dans les GUV en comparaison avec l'arsénite de sodium qui induit une répression d'un nombre plus important d'ARNm.

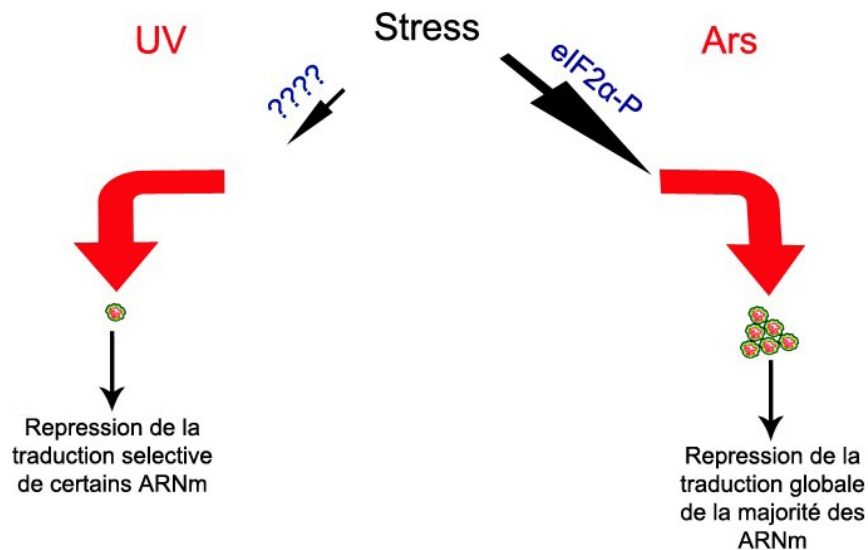


Figure IV. 1 : Modèle proposé de la formation des granules induits par UV et des granules de stress induit par l'arsénite de sodium.

Chapitre V :

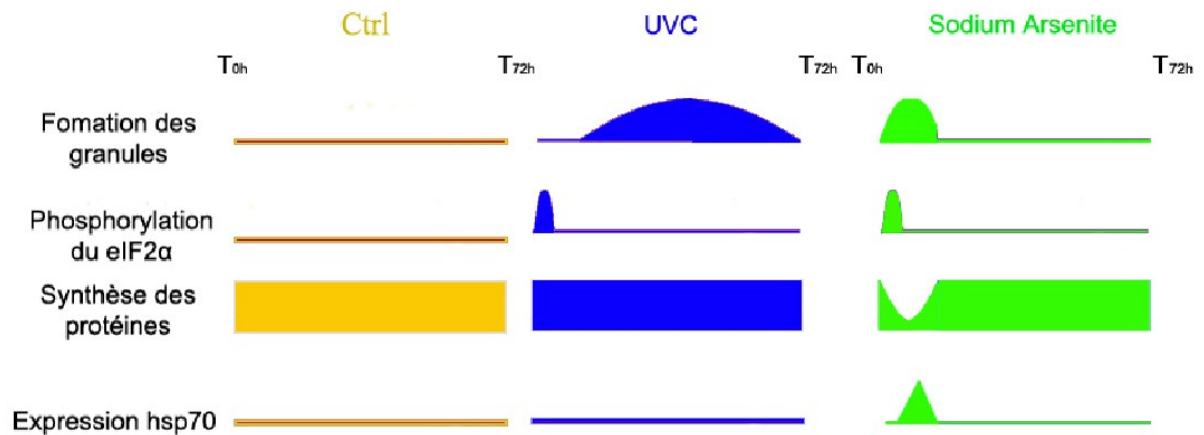
Conclusion

V- CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons montré que l'irradiation aux ultraviolets induit la formation des petits granules à ARN cytoplasmiques (GUV). Ces granules ne sont pas des processing bodies et semblent être des granules de stress avec des particularités spécifiques dans leur cinétique d'apparition, leur taille et leur formation indépendante de la phosphorylation du facteur eIF2 α .

Comme les autres granules à ARN, les GUV sont des structures réversibles et hautement dynamiques. De façon étonnante, le stress UV semble induire très faiblement si pas l'expression de Hsp70 et ne cause pas un arrêt global de la traduction.

Il existerait probablement une réponse cellulaire cytoplasmique spécifique aux dommages causés par l'exposition aux UV. Cette réponse se traduit par un blocage de la prolifération et la repression probable de la traduction de certains ARNm seulement au niveau des GUV. Nous proposons que ces ARNm codent pour des facteurs importants de prolifération cellulaire.



Chapitre VI :

Annexe

VI-ANNEXE

Tableau IV : Les principaux composants présents dans les granules de stress (Liste non exhaustive)

	Nom	Fonctions	Références
ARN	ARNm poly(A) ⁺	Messenger	Kedersha et al., 1999
Ribosome	40S	Traduction des ARNm	Kedersha et al., 2002
Facteurs de la traduction	eIF1A, eIF2, eIF3	Régulation de la traduction	Kedersha et al., 2002
	P-eIF2 α	Facteur d'initiation de la traduction	Kimball et al., 2003
	eIF2B	Facteur d'échange de guanine pour eIF2	Kimball et al., 2003
	eIF4A	Helicase à RNA	Kedersha et al., 2000
	eIF4B	Régulation de la traduction (Interagit avec eIF3)	Low et al., 2005
	eIF4E	Régulation de la traduction (Cap binding protein)	Kedersha et al., 2002
	eIF4G	Régulation de la traduction (échafaudage)	Kedersha et al., 2002
	P97/NAT1	Homologue du eIF4G, régulation de la traduction	Nousch et al., 2007
	hMex3B	Régulation de la traduction	Buchet-Poyau et al., 2007
	PABP-1	Stabilité des ARN et régulation de la traduction	Kedersha et al., 1999
	HuR	Export nucléaire et stabilité des ARN	Gallouzi et al., 2000
TIA-1	Répression de la traduction	Kedersha et al., 2002	

	TIAR	Répression de la Traduction	Kedersha et al., 2002
	FMRP	Régulation de la traduction	Mazroui et al., 2002
	FXR1P	Régulation de la traduction	Mazroui et al., 2002
	FXR2P	Régulation de la traduction	Mazroui et al., 2002
	Smaug	Répression de la traduction	Baez et Boccaccio, 2005
	Pum1	Régulation de la traduction, nucléation des GS	Morris et al., 2008
	Pum2	Régulation de la traduction, nucléation des GS	Vessey et al., 2006
	Sam68	Régulation de la traduction	Henao-Mejia et He, 2009
	SERBP1	Stabilité d'ARNm	Goulet et al., 2008
	YB-1	Cold-shock RNA binding protein	Yang et Bloch, 2007
	Caprin-1	Prolifération cellulaire et Régulation de la traduction	Solomon et al., 2007
	CPEB	Régulation de la traduction	Wilczynska et al., 2005
	Staufen	Transport des ARN	Thomas et al., 2005
	SMN	Assemblage des RNP	Hua et Zhou, 2004
	CIRP	Régulation de la traduction	De Leeuw et al., 2007
	MBNL1	Epissage et stabilité d'ARNm	Onishi et al., 2008
	Musashi	Régulation de la traduction	Kawahara et al., 2008
	CUGBP1	Epissage d'ARN, régulation de la traduction, stabilité d'ARNm	Fujimura et al., 2008
	ZBP1	Localisation (protéine de liaison à ADN)	Stöhr et al., 2006
	RBM42	Protéine de liaison a ARN nucléaire	Fukuda et al., 2009

	FUS	Proteine de liaison à l'ARN	Andersson et al., 2008
	EWS	Proteine de liaison à l'ARN	Andersson et al., 2008
Signalisation	RHAU	Helicase à ARN, rôle dans la stabilité d'ARNm	Chalupníková et al., 2008
	RSK2	Ribosomal S6 kinase, Régulation anti-apoptotique	Eisinger-Mathason et al., 2008
	FAK	Kinase; phosphorylation de Grb7	Tsai et al., 2008
	TRAF2	Voie d'activation de NF-KB	Kim et al., 2005
	IP5K	Signalisation	Brehm et al., 2007
	Plakophilins 1 et 3	Adhésion	Hofmann et al., 2006
	Grb7	Régulation de la traduction, rôle dans la nucléation et désassemblage des GS	Tsai et al., 2008
	AKAP350	Protéine d'échafaudage pour la signalisation cellulaire	Kolobova et al., 2009
Régulation de la traduction	Pumilio 2	Répression de la traduction	Vessey et al., 2006
	FAST	Régulation de la traduction	Kedersha et al., 2005
	Ataxin-2	Traduction	Nonhoff et al., 2007
	G3BP-1	Stabilité et régulation de la traduction des ARN	Tourrière et al., 2003
	PRTB	Régulation de la traduction,	Kim et al., 2008
Micro-tubule	DIS1	Nucléation des GS (se lie aux microtubules)	Ogawa et al., 2005
	DIC1/DH C1	Chaîne intermédiaire de la dynéine/Chaîne lourde de la dynéine	Loschi et al., 2009
	KHC/KLC	Chaîne lourde de la Kinésine /Chaîne légère de la kinésine	Loschi et al., 2009
Apoptose	RACK1	Régulation d'apoptose, protéines	Arimoto et al., 2008

		d'échafaudage	
	CCAR1	Régulation d'apoptose	Kolobova et al., 2009
	Prohibitin 2	Régulation d'apoptose mitochondrial	Ohn et al., 2008
Dégradation des ARNm	TTP	Dégradation des ARNm	Stoecklin et al., 2004
	BRF1	Paralogue de TTP	Stoecklin et al., 2004
	PMR1	Endonucléase, dégradation des ARNm	Yang et al., 2006
	Rck/p54	Co-activateur de décoiffage, dégradation des ARN	Wilczynska et al., 2005
	FBP/KSRP	Dégradation d'ARNm	Rothé et al., 2006
Voie des microARN	Argonaute 1	Voie de régulation par microARN et siRNA	Leung et al., 2006
	Argonaute 2	Voie de régulation par microARN et siRNA	Leung et al., 2006
	Argonaute 3	Voie de régulation par microARN et siRNA	Leung et al., 2006
	Argonaute 4	Voie de régulation par microARN et siRNA	Leung et al., 2006
	microARN	Régulation et dégradation des ARNm	Leung et al., 2006
	Roquin	E3 ubiquitin ligase, impliqué dans la voie des microARN et dans la stabilité d'ARNm	Vinuesa et al., 2005
	Lin28	Protéine de liaison à ARN, bloque la maturation du microARN let7	Balzer et Moss, 2007
	RAP55, LSml4	Surveillance d'ARNm	Yang et al., 2007
Epissage	TDP-43	Régulation d'epissage, Transport d'ARNm	Colombrita et al., 2009

	MLN51	Epissage	Baguet et al., 2007
	hnRNP A1	Rôle dans l'épissage, l'export, la stabilité et la régulation de la traduction d'ARNm	Guil et al., 2006
	hnRNP Q	Rôle dans l'épissage, l'export, la stabilité et la régulation de la traduction d'ARNm	Quaresma et al., 2009
	hnRNP K	Rôle dans le remodelage de la chromatine, la transcription, l'épissage, l'export, la stabilité et la régulation de la traduction d'ARNm	Fukuda et al., 2009
Autres	MLN51	Exon-Junction complex component (rôle dans épissage)	Baguet et al., 2007
	APOBEC3 G	Cytidine déaminase (fonction antivirale)	Kozak et al., 2006
	TDRD3	Protéine de liaison Tudor/Ub-	Goulet et al., 2008
	SGNP	Putative rRNA processing factor	Zhu et al., 2008
	DDX1	ARN helicase	Onishi et al., 2008
	DDX3/De d1	Helicase à ARN, régulation de la traduction, export d'ARNm	Lai et al., 2008
	PCBP2	Stimulateur de la traduction IRES	Fujimura et al., 2008
	HSP27	Protein de choc thermique	Kedersha et al., 1999
	Importine alpha1	Importation nucléaire des protéines	Fujimura et al., 2010
	Importine-8	Importation nucléaire des protéines	Weinmann et al., 2009
	MEX67	Facteur d'exportation nucléaire d'ARNm	Lai et al., 2008
	Rpb4p	Transcription	Lotan et al., 2005

	SRC3	Transcription	Yu et al., 2007
	TAF15	Transcription	Andersson et al., 2008
	LINE1 ORF1p	Transposon	Goodier et al., 2007
	Calreticuli n	Chaperone du RE	Decca et al., 2007
	PQBP1	Maladies neurodegeneratives	Kunde et al., 2011

Tableau V : Les principaux composants des P-bodies (Liste non exhaustive)

	Composant	Fonctions	Référence
Dégradation de l'ARN	Xrn1	5'-3' exoribonuclease	Bashkirov et al., 1997
	TTP	Dégradation des ARNm	Fenger-Grøn et al., 2005
	BRF1	Paralogue de TTP	Kedersha et al., 2005
	BRF2	Paralogue de TTP	Stoecklin et Anderson, 2007
	Pan2	Initiation de déadénylation	Zheng et al., 2008
	Pan3	Initiation de déadénylation	Zheng et al., 2008
	Pop2/Caf1	Déadénylation	Zheng et al., 2008
	TOB2	Activateur de déadénylation	Ezzeddine et al., 2007
	Complexe CCR4-CAF1-NOT	Déadénylation	Sheth et Parker, 2003
	Dcp1	Enzyme activateur de décoiffage	Ingelfinger et al., 2002
	Dcp2	Enzyme de décoiffage	Van Dijk et al., 2002, Ingelfinger et al., 2002
	Ro52	activateur de décoiffage/ se lie a Dcp2	Yamochi et al., 2008
	RCK/P54 (Dhh1)	Co-activateur de décoiffage	Sheth et Parker, 2003
	hEdc3	Co-activateur de décoiffage	Kshirsagar et Parker, 2004
	RAP55	Co-activateur de décoiffage	Yang et al., 2006 a
	Hedls, Ge-1	Co-activateur de décoiffage	Yu et al., 2005
	Lsm1-7	Complexe co-activateur de décoiffage	Ingelfinger et al., 2002

	Edc3, Lsm16	Activateur de décoiffage, sert comme protéine d'échaffaudage pour l'aggregation des P bodies	Fenger-Grøn et al., 2005
	Pat1	Co-activateur de décoiffage	Scheller et al., 2007
Surveillance de l'ARNm	SMG5	Surveillance ARN, activateur la voie NMD	Unterholzner et Izaurralde, 2004
	SMG6	Impliqué dans la voie NMD	Durand et al., 2007
	SMG7	Surveillance ARN, activateur la voie NMD	Unterholzner et Izaurralde, 2004
	UPF1	Surveillance ARN, activateur la voie NMD	Unterholzner et Izaurralde, 2004
	UPF2-3	Surveillance ARN, activateur la voie NMD	Unterholzner et Izaurralde, 2004
Voie des microARN	Argonaute1	Voie de régulation par microARN et siRNA	Liu et al., 2005
	Argonaute 2	Voie de régulation par microARN et siRNA	Liu et al., 2005
	Argonaute 3	Voie de régulation par microARN et siRNA	Liu et al., 2005
	Argonaute 4	Voie de régulation par microARN et siRNA	Liu et al., 2005
	TNRC6B	Paralogue de GW182	Meister et al., 2005
	TNRC6C	Paralogue de GW182	Schneider et al., 2006
	GW182	Voie du microARN	Eystathioy et al., 2002
	Lin28	Bloque le processing du microARN let7	Balzer et al., 2007
Autres	Importin-8	Importine	Weinmann et al., 2009
	FAST	Epissage alternatif	Kedersha et al., 2005
	APOBEC3G	Cytidine déaminase : fonction antivirale	Wichroski et al., 2006

	PNRC2	Lié au Upf1 hyperphosphorylée dans P-bodies	Cho et al., 2009
	HuD	Neuronal RNA-binding protein	Blumenthal et Ginzburg, 2008
	MOV10	Helicase ARN, nécessaire pour l'induction du clivage par siRNA	Meister et al., 2005
	Dcs2		Malys et al., 2006
	CPEB	Régulateur traductionnel	Wilczynska et al., 2005
	Htt	Impliqué dans la maladie de Huntingdon	Savas et al., 2008
	hnRNP A3	Régulateur de la traduction, export	Katahira et al., 2008
	hMex3A	Régulateur de la traduction	Buchet-Poyau et al., 2007
	PCBP2	IRES mediated Translation	Fujimura et al., 2008
	eIF4E	Facteur d'initiation de la traduction	Andrei et al., 2005
	eIF4E-T	Répresseur traductionnel	Andrei et al., 2005

Chapitre VII :

Références

VII- RÉFÉRENCES

- Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y. (2008) The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell*. 19 : 4154-4166.
- Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. (2005) Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7 : 415-425.
- Anderson P and Kedersha N. (2002) Stressful initiations. *Journal of Cell Science*. 115 : 3227-3234.
- Anderson P and Kedersha N. (2008) Stress granules : the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*. 33 : 141–150.
- Anderson P, Kedersha N. (2006) RNA granules. *J Cell Biol*. 172 : 803-808.
- Anderson P, Kedersha N. (2009) RNA granules : post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10 : 430-436.
- Anderson P, Kedersha N. (2009) Stress granules. *Curr Biol*. 19 : R397-8.
- Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, Nilsson O, Aman P. (2008) The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol*. 11 : 9-37.
- Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R. (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*. 11 : 717-727.
- Aragón T, van Anken E, Pincus D, Serafimova IM, Korennykh AV, Rubio CA, Walter P. (2009) Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature*. 457 : 736-740.
- Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M. (2008) Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol*. 10 : 1324-1332.
- Arrigo AP, Fakan S, Tissières A (1980). Localization of the heat shock-induced proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Dev Biol*. 78 : 86-103.
- Baez MV, Boccaccio GL. (2005) Mammalian Smaug is a translational repressor that forms cytoplasmic foci similar to stress granules. *J Biol Chem*. 280 : 43131-43140.
- Baguet A, Degot S, Cougot N, Bertrand E, Chenard MP, Wendling C, Kessler P, Le Hir H, Rio MC, Tomasetto C. (2007) The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress granule assembly. *J. Cell Sci*. 120 : 2774-2784.
- Balzer E and Moss EG. (2007) Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biol*. 4 : 16–25.

Bartoli KM, Bishop DL, Saunders WS. (2011) The Role of Molecular Microtubule Motors and the Microtubule Cytoskeleton in Stress Granule Dynamics. *International Journal of Cell Biology*. 2011:939848

Bashkirov VI., Scherthan H., Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD. (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* 136 : 761-773.

Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H, Bardoni B. (2009) A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol.* 7:e16.

Beckham C, Hilliker A, Cziko AM, Noueir A, Ramaswami M, Parker R. (2008) The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. *Mol Biol Cell.* 19 : 984-993.

Beelman CA and Parker R. (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell.* 81 : 179-183.

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

Bender K, Blattner C, Knebel A, Iordanov M, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. (1997) UV-induced signal transduction. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 37 : 1-17.

Ben-Ze'ev A, Duerr A, Solomon F, Penman S. (1979) The outer boundary of the cytoskeleton: a lamina derived from plasma membrane proteins. *Cell.* 17 : 859-865.

Berwick M, Lachiewicz A, Pestak C, Thomas N. (2008) Solar UV exposure and mortality from skin tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 624 : 117-124.

Biamonti G and Vourc'h C. (2010) Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (6) : a000695.

Bloch DB, Gulick T, Bloch KD, Yang WH. (2006) Processing body autoantibodies reconsidered. *RNA* 12 : 707-709.

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

Bollig F, Winzen R, Kracht M, Ghebremedhin B, Ritter B, Wilhelm A, Resch K, Holtmann H. (2002) Evidence for general stabilization of mRNAs in response to UV light. *Eur J Biochem.* 269 : 5830-5839.

Bonnerot C, Boeck R, Lapeyre B. (2000) The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 5939-5946.

Bordeleau ME, Mori A, Obérier M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J. (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol.* 2 : 213-220.

- Boukamp P. (2005) UV-induced skin cancer : Similarities–variations. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 3 : 493-503.
- Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Seraphin B. (2000) A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* 19 : 1661-1671.
- Brehm MA, Schenk TM, Zhou X, Fanick W, Lin H, Windhorst S, Nalaskowski MM, Kobras M, Shears SB, Mayr GW. (2007) Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6) P 52 Kinase. *Biochem J.* 408 : 335-345.
- Brengues M, Teixeira D, Parker R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science.* 310 : 486-489.
- Buchan JR and Parker R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 36 : 932-941.
- Buchan JR, Muhlrad D, Parker R. (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 183 : 441-455.
- Buchet-Poyau K, Courchet J, Le Hir H, Séraphin B, Scoazec JY, Duret L, Domon-Dell C, Freund JN, Billaud M. (2007) Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies. *Nucleic Acids Res.* 35 : 1289-1300.
- Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 12 : 3295–3305.
- Chalupníková K, Lattmann S, Selak N, Iwamoto F, Fujiki Y, Nagamine Y. (2008) Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain. *J Biol Chem.* 283 : 35186-35198.
- Chen CY, Shyu AB. (1995) AU-rich elements : characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 20 : 465-470.
- Cho H, Kim KM, Kim YK. (2009) Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein2 mediates an interaction between mRNP surveillance machinery and decapping complex. *Mol. Cell.* 33 : 75-86.
- Clemens MJ. (2001) Initiation factor eIF2 α phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 27 : 57-89.
- Collier NC, Heuser J, Levy MA, Schlesinger MJ. (1988) Ultrastructural and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol.* 106 : 1131-1139.
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, Buratti E, Silani V, Ratti A. (2009) TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J Neurochem.* 111 : 1051-1061.
- Conti E and Izaurralde E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 316-325.
- Cougot N, Babajko S, Seraphin B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* 165 : 31-40.

Craig EA, Yan W, James P. (1999) Molecular chaperones and folding catalysis. *Amsterdam, Harwoodp.* 139-162.

Culbertson MR. (1999) RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* 15 : 74-80.

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

De Leeuw F, Zhang T, Wauquier C, Huez G, Kruys V, Gueydan C. (2007) The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Exp Cell Res.* 313 : 4130-4144.

Decca MB, Carpio MA, Bosc C, Galiano MR, Job D, Andrieux A, Hallak ME. (2007) Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J Biol Chem.* 282 : 8237-8245.

Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Cobiانchi F, Riva S, Biamonti G. (2004) Stress-induced Nuclear Bodies Are Sites of Accumulation of Pre-mRNA Processing Factors. *Mol Biol Cell.* 12 : 3502-3514.

Didiot MC, Subramanian M, Flatter E, Mandel JL, Moine H. (2009) Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. *Mol Biol Cell.* 20 : 428-437.

Didiot MC, Tian Z, Schaeffer C, Subramanian M, Mandel JL, Moine H. (2008) The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucleic Acids Res.* 36 : 4902-4912.

Diffey BL. (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28 : 4-13.

Dolzanskaya N, Merz G, Aletta JM, Denman RB. (2006) Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci.* 119 : 1933-1946.

Durand S, Cougot N, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, Grierson DS, Bertrand E, Tazi J, Lejeune F. (2007) Inhibition of non sense mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.* 178 : 1145-1160.

Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Mol. Genet.* 5 : 1083-1091.

Eisinger-Mathason TS, Andrade J, Groehler AL, Clark DE, Muratore-Schroeder TL, Pasic L, Smith JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Macara IG, Lannigan DA. (2008) Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell.* 31 : 722-736.

- Emara MM and Brinton MA. (2007) Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 9041-9046.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. (2007a) P bodies : at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8 : 9-22.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. (2007b) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. 27 : 3970-3981.
- Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell*. 13 : 1338-1351.
- Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EK, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ. (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. 9 : 1171-1173.
- Ezzeddine N, Chang TC, Zhu W, Yamashita A, Chen CY, Zhong Z, Yamashita Y, Zheng D, Shyu AB. (2007) Human TOB, an anti proliferative transcription factor is a poly(A)-binding protein dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol*. 27 : 7791-7801.
- Fasken MB and Corbett AH. (2005) Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nature Struct. Mol. Biol*. 12 : 482-488.
- Feng Y, Absher D, Eberhart ED, Brown V, Malter EH, Warren ST. (1997) FMRP Associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N Mutation of severe Fragil X Syndrome Abolishes This Association. *Mol. Cell*. 1 : 109-118.
- Fenger-Grøn M, Fillman C, Norrild B, Lykke-Andersen J. (2005) Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol. Cell*. 20 : 905-915.
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N. (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell Biol*. 170 : 913-924.
- Franks T and Lykke-Andersen J. (2008) The Control of mRNA Decapping and P-Body Formation. *Mol Cell*. 32 : 605-615.
- Franks TM, Lykke-Andersen J. (2007) TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev*. 21 : 719-735.
- Frischmeyer PA, Dietz HC. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*. 8 : 1893-1900.
- Fujimura K, Kano F, Murata M. (2008) Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. *RNA*. 14 : 425-431.
- Fujimura K, Katahira J, Kano F, Yoneda Y, Murata M. (2009) Microscopic dissection of the process of stress granule assembly. *Biochim Biophys Acta*. 1793 : 1728-1737.

- Fujimura K, Suzuki T, Yasuda Y, Murata M, Katahira J, Yoneda Y. (2010) Identification of importin alpha1 as a novel constituent of RNA stress granules. *Biochim Biophys Acta*. 1803 : 865-871.
- Fukuda T, Naiki T, Saito M, Irie K. (2009) hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells*. 14 : 113-128.
- Gaillard H and Aguilera A. (2008) A novel class of mRNA-containing cytoplasmic granules are produced in response to UV-irradiation. *Mol Biol Cell*. 19 : 4980-4992.
- Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH. (2007) Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol*. 81 : 2165-2178.
- Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA. (2000) HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci*. 97 : 3073-3078.
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440 : 631-636.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell*. 15 : 5383-5398.
- Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH Jr. (2007) LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol. Cell. Biol*. 27 : 6469-6483.
- Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Côté J. (2008) TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet*. 17 : 3055-3074.
- Gowrishankar G, Winzen R, Dittrich-Breiholz O, Redich N, Kracht M, Holtmann H. (2006) Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol Chem*. 387 : 323-327.
- Grousl T, Ivanov P, Frýdlová I, Vasicová P, Janda F, Vojtová J, Malínská K, Malcová I, Nováková L, Janosková D, Valásek L, Hasek J. (2009) Robust heat shock induces eIF2alpha-phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 122 : 2078-2088.
- Gruber F, Peharda V, Kastelan M, Brajac I. (2007) Occupational skin diseases caused by UV radiation. *Acta Dermatovenerol. Croat*. 15 : 191-198.
- Guil S, Long JC, Cáceres JF. (2006) hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol*. 26 : 5744-5758.
- Henao-Mejia J and He JJ. (2009) Sam68 relocalization into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1. *Exp Cell Res*. 315 : 3381-3395.

- Herrlich P, Karin M, Weiss C. (2008) Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol. Cell* 29 : 279-290.
- Hilgers V, Teixeira D, Parker R. (2006) Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 12 : 1835-1845.
- Hofmann I, Casella M, Schnölzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW. (2006) Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins1 and 3 to stress granules. *Mol. Biol. Cell*. 17 : 1388-1398.
- Holcik M, Sonenberg N. (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6 : 318-327.
- Houseley J, LaCava J, Tollervey D. (2006) RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 7 : 529-539.
- Hovland R, Hesketh JE, Pryme IF. (1996) The compartmentalization of protein synthesis: importance of cytoskeleton and role in mRNA targeting. *Int J Biochem Cell Biol*. 28 : 1089-1105.
- Hoyle NP, Castelli LM, Campbell SG, Holmes LE, Ashe MP. (2007) Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J Cell Biol*. 179 : 65-74.
- Hua Y and Zhou J. (2004) Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett*. 572 : 69-74.
- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Luhrmann R, Achsel T. (2002) The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*. 8 : 1489-1501.
- Ivanov PA, Chudinova EM, Nadezhkina ES. (2003) Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. *Exp Cell res*. 290 : 227-233.
- Jeon SJ, Seo JE, Yang SI, Choi JW, Wells D, Shin CY, Ko KH. (2011) Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades. *J Biomed Sci*. 13;18:17.
- Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, Khochbin S, Vourc'h C. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol*. 164 : 25-33.
- Jolly C, Morimoto RI. (1999) Stress and the cell nucleus: dynamics of gene expression and structural reorganization. *Gene Expr*. 7 : 261-270.
- Katahira J, Miki T, Takano K, Maruhashi M, Uchikawa M, Tachibana T, Yoneda Y. (2008) Nuclear RNA export factor 7 is localized in processing bodies and neuronal RNA granules through interactions with shuttling hnRNPs. *Nucleic Acids Res*. 36 : 616-628.
- Kawahara H, Imai T, Imataka H, Tsujimoto M, Matsumoto K, Okano H. (2008) Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *J Cell Biol*. 181 : 639-653.
- Kedersha N, Anderson P. (2002) Stress granules : sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*. 30 : 963-969.

- Kedersha N, Chen S, Gilks N, Li W, Miller I, Stahl J, Anderson P. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell*. 13 : 195-210.
- Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *Journal of Cell Biology*. 151 : 1257-1268.
- Kedersha N, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 147 : 1431-1442.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol*. 169 : 871-884.
- Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F. (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nature Genet*. 12 : 91-93.
- Khandjian EW, Bechara E, Davidovic L, Bardoni B. (2005) Fragile X Mental Retardation Protein: Many partners and multiple targets for a promiscuous function. *Curr Genomics* 6 : 515-522.
- Khandjian EW, Tournier B, Séguin S, Tremblay S, De Koninck P and Davidovic L. (2009) RNA Granules : Functions within Presynaptic Terminals and Postsynaptic Spines. In : Squire LR (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*. 8 : 389-395.
- Kim JE, Ryu I, Kim WJ, Song OK, Ryu J, Kwon MY, Kim JH, Jang SK. (2008) Proline-rich transcript in brain protein induces stress granule formation. *Mol Cell Biol*. 28 : 803-813.
- Kim WJ, Back SH, Kim V, Ryu I, Jang SK. (2005) Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol*. 25 : 2450-2462.
- Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284 : 273-284.
- Kolobova E, Efimov A, Kaverina I, Rishi AK, Schrader JW, Ham AJ, Larocca MC, Goldenring JR. (2009) Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules. *Exp Cell Res*. 315 : 542-555.
- Kozak SL, Marin M, Rose KM, Bystrom C, Kabat D. (2006) The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem*. 281 : 29105-29119.
- Kshirsagar M and Parker R. (2004) Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 166 : 729-739.
- Kunde SA, Musante L, Grimme A, Fischer U, Müller E, Wanker EE, Kalscheuer VM. (2011). The X-chromosome linked intellectual disability protein PQBP1 is a component

of neuronal RNA granules and regulates the appearance of stress granules. *Hum Mol Genet.* 20 : 4916-4931

Kwon S, Zhang Y, Matthias P. (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev.* 21 : 3381-3394.

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 10 : 329-338.

Lai MC, Lee YH, Tarn WY. (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell.* 19 : 3847-3858.

Lam QL, Liu S, Cao X, Lu L. (2006) Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 36 : 3118-3130.

Lapointe G. (2004) Translocation de certains RNP cytoplasmique « solubles » à la fraction insoluble de la matrice cellulaire résiduelle lors d'un stress thermique. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval.

Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. (1999) Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 284 : 499-502.

Lejeune F and Maquat LE. (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 309-315.

Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA. (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci.* 103 : 18125-18130.

Li GC and Werb Z. (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79: 3218-3122.

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

Lian S, Jakymiw A, Eystathioy T, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. (2006) GW bodies, microRNAs and the cell cycle. *Cell Cycle.* 5 : 242-245.

Lian XJ, Gallouzi IE. (2009) Oxidative Stress Increases the Number of Stress Granules in Senescent Cells and Triggers a Rapid Decrease in p21waf1/cip1 Translation. *J Biol Chem.* 284 : 8877-8887.

Lin MD, Fan SJ, Hsu WS, Chou TB. (2006) Drosophila decapping protein 1, dDcpl, is a component of the oskar mRNP complex and directs its posterior localization in the oocyte. *Dev Cell.* 10 : 601-613.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. (2005) MicroRNA dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7 : 719-723.

Loschi M, Leishman CC, Berardone N, Boccaccio GL. (2009) Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *J Cell Sci.* 122 : 3973-3982.

- Lotan R, Bar-On VG, Harel-Sharvit L, Duek L, Melamed D, Choder M. (2005) The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev.* 19 : 3004-3016.
- Low WK, Dang Y, Schneider-Poetsch T, Shi Z, Choi NS, Merrick WC, Romo D, Liu JO. (2005). Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product patéamine A. *Mol Cell.* 20 : 709-722.
- Lykke-Andersen J. (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 8114-8121.
- Mähl P, Lutz Y, Puvion E, Fuchs JP. (1989) Rapid effect of heat shock on two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-associated antigens in HeLa cells. *J Cell Biol.* 109 : 1921-1935.
- Mahowald A. (1963a) Developmental Morphology of Polar Granules Including Observations on Pole Cell Behavior and Distribution During Embryogenesis. *J Morph.* 112 : 129-145.
- Mahowald, A. (1963b) Electron Microscopy of the Formation of the Cellular Blastoderm in *Drosophila Melanogaster*. *Exp Cell Res.* 32 : 457-468.
- Mahowald, A. (1968) Polar granules of *Drosophila*. II. Ultrastructural changes during early embryogenesis. *J Exp Zool.* 167 : 237-261.
- Mahowald, A. (1971) Polar granules of *Drosophila*. 3. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*. *J Exp Zool.* 176 : 329-343.
- Malys N and Mc Carthy JE. (2006) Dcs2 a novel stress-induced modulator of m7GpppX pyrophosphatase activity that locates to P bodies. *J. Mol. Biol.* 363 : 370-382.
- Maquat LE and Carmichael GG. (2001) Quality control of mRNA function. *Cell.* 104 : 173-176.
- Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE. (2007) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell.* 18 : 2603-2618.
- Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet.* 11 : 3007-3017.
- Mazroui R, Sukarieh R, Bordeleau ME, Kaufman RJ, Northcote P, Tanaka J, Gallouzi I, Pelletier J. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 17 : 4212-4219.
- McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ. (2005) Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem.* 280 : 16925-16933.
- McKendrick L, Pain VM, Morley SJ. (1999) Translation initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol.* 31 : 31-35.

- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. (2005) Identification of novel argonaute associated proteins. *Curr. Biol.* 15 : 2149–2155.
- Mokas S, Mills JR, Garreau C, Fournier MJ, Robert F, Arya P, Kaufman RJ, Pelletier J, Mazroui R. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell.* 20 : 2673-2683.
- Mollet S, Cougot N, Wilczynska A, Dautry F, Kress M, Bertrand E, Weil D. (2008) Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol Biol Cell.* 19 : 4469-4479.
- Montero H, Rojas M, Arias CF, López S. (2008) Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J Virol.* 82 : 1496-1504.
- Morris AR, Mukherjee N, Keene JD. (2008) Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets. *Mol Cell Biol.* 28 : 4093-4103.
- Moser JJ and Fritzler MJ. (2010) Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *Int J Biochem Cell Biol.* 42 : 828-843.
- Muthusamy V and Piva TJ. (2010) The UV response of the skin: a review of the MAPK, NfKappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res.* 302 : 5-17.
- Nadezhdina ES, Lomakin AJ, Shpilman AA, Chudinova EM, Ivanov PA. (2010) Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 1803 : 361-371.
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitsch S. (2007) Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 1385-1396.
- Nousch M, Reed V, Bryson-Richardson RJ, Currie PD, Preiss T. (2007) The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *RNA.* 13 : 374-384.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D. (1983) Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol.* 3 : 1648-1655.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D. (1989) Cytoplasmic Heat Shock Granules Are Formed from Precursor Particles and Are Associated with a Specific Set of mRNAs. *Mol Cell Biol.* 9 : 1298-1308.
- Ogawa F, Kasai M, Akiyama T. (2005) A functional link between Disrupted-In-Schizophrenia1 and the eukaryotic translation initiation factor3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 : 771-776.
- Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P. (2008) A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol.* 10 : 1224-1231.
- Onishi H, Kino Y, Morita T, Futai E, Sasagawa N, Ishiura S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J Neurosci Res.* 86 : 1994-2002.

- Parker R and Sheth U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*. 25 : 635-646.
- Parker R, Song H. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11 : 121-127.
- Parsell DA, Taulien J, Lindquist S. (1993) The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 339 : 279-285.
- Pothof J, Verkaik NS, Hoeijmakers JH, van Gent DC. (2009) MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response. *Cell Cycle*. 8 : 3462-3468.
- Quaresma AJ, Bressan GC, Gava LM, Lanza DC, Ramos CH, Kobarg J. (2009) Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments. *Exp Cell Res*. 315 : 968-980.
- Ritossa F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cell Molec Life*. 18 : 571-573.
- Rizzi N, Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Valgardsdottir R, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G. (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell*. 15 : 543-551.
- Rothé F, Gueydan C, Bellefroid E, Huez G, Kruys V. (2006) Identification of FUSE-binding proteins as interacting partners of TIA proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 : 57-68.
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol*. 13 : 1392-1407.
- Savas JN, Makusky A, Ottosen S, Baillat D, Then F, Krainc D, Shiekhatar R, Markey SP, Tanese N. (2008) Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proc Natl Acad Sci*. 105 : 10820-10825.
- Scheller N, Resa-Infante P, de la Luna S, Galao RP, Albrecht M, Kaestner L, Lipp P, Lengauer T, Meyerhans A, Diez J. (2007) Identification of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. *Biochim. Biophys. Acta*. 1773 : 1786-1792.
- Schneider MD, Najand N, Chaker S, Pare JM, Haskins J, Hughes SC, Hobman TC, Locke J, Simmonds AJ. (2006) Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early Drosophila development. *J. Cell Biol*. 174 : 349-358.
- Sen GL and Blau HM. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. 7 : 633-636.
- Serman A, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D. (2007) GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res*. 35: 4715-4727
- Seydoux G and Braun RE. (2006) Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell*. 127 : 891-904.

Sheth U and Parker R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300 : 805-808.

Sheth U and Parker R. (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell*. 125 : 1095-1109.

Simpson-Holley M, Kedersha N, Dower K, Rubins KH, Anderson P, Hensley LE, Connor JH. (2011) Formation of antiviral cytoplasmic granules during orthopoxvirus infection. *J Virol*. 85 : 1581-1593.

Sinha RP, Häder DP. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 1 : 225-236.

Sjekloća L, Konarev PV, Eccleston J, Taylor IA, Svergun DI and Pastore A. (2009) A study of the ultrastructure of fragile-X-related proteins. *Biochem J*. 419 : 347-357.

Sjekloća L, Pauwels K, Pastore A. (2011) On the aggregation properties of FMRP--a link with the FXTAS syndrome? *FEBS J*. 278 : 1912-1921

Solomon S, Xu Y, Wang B, David MD, Schubert P, Kennedy D, Schrader JW. (2007) Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol Cell Biol*. 27 : 2324-2342.

Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, Weil D. (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci*. 122 : 3619-3626.

Sprecher E. (2007) Genetic factors in the pathogenesis of UV-induced skin cancer. *Curr. Probl. Dermatol*. 35 : 28-38.

Stoecklin G, Anderson P. (2007) In a tight spot : ARE-mRNAs at processing bodies. *Genes Dev*. 21 : 627-631.

Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P. (2004) MK2-induced tristetraprolin : 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J*. 23 : 1313-1324.

Stöhr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Huttelmaier S. (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol*. 175 : 527-34.

Sweet TJ, Boyer B, Hu W, Baker KE, Collier J. (2007) Microtubule disruption stimulates P-body formation. *RNA*. 13 : 493-502.

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*. 11 : 371-382.

Tharun S and Parker R. (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell*. 8 : 1075-1083.

Tharun S, He W, Mayes AE, Lennertz P, Beggs JD, Parker R. (2000) Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature*. 404 : 515-518.

- Tharun S, Muhlrud D, Chowdhury A, Parker R. (2005) Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* LSM1 gene that affect mRNA decapping and 3' end protection. *Genetics*. 170 : 33-46.
- Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. (2011) RNA granules : the good, the bad and the ugly. *Cell Signaling*. 23 : 324-334.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Desbats MA, Leishman CC, Boccaccio GL. (2009) Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci*. 122 : 563-573.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL. (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell*. 16 : 405-420.
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 84 : 389-98.
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*. 160 : 823-831.
- Tsai NP, Ho PC, Wei LN. (2008) Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway. *EMBO J*. 27 : 715-26.
- Tsai NP, Tsui YC, Wei LN. (2009) Dynein motor contributes to stress granule dynamics in primary neurons. *Neuroscience*. 159 : 647-656.
- Unterholzner L and Izaurralde E. (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell*. 16 : 587-596.
- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 20 : 515-524.
- Van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B. (2002) Human Dcp2 : a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*. 21 : 6915-6924.
- Velazquez JM, DiDomenico BJ, Lindquist S. (1980). Intracellular localization of heat shock proteins in *Drosophila*. *Cell*. 20 : 679-689.
- Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, Karra D, Kiebler MA, Macchi P. (2006) Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *J. Neurosci*. 26 : 6496–6508.
- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschenz H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ, Goodnow CC. (2005) A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 435 : 452-458.
- Weber LA. (1992) Relationship of heat shock proteins and induced thermal resistance. *Cell Prolif*. 25 : 101-113.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. (1997) Fragile X mental retardation protein is

translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 5395-5400.

Weiler IJ, Spangler CC, Klintsova AY, Grossman AW, Kim SH, Bertaina-Anglade V, Khaliq H, de Vries FE, Lambers FA, Hatia F, Base CK, Greenough WT. (2004) Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 17504-17509.

Weiler IJ. (2005) FMRP and the regulation of protein translation near synapses. In : The molecular basis of Fragile X syndrome (Denman RB, Sung YJ, eds) pp. 201-215. *Kerala, India: Research Signpost*.

Weinmann L, Höck J, Ivacevic T, Ohrt T, Mütze J, Schwille P, Kremmer E, Benes V, Urlaub H, Meister G. (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell*. 136 : 496-507.

Wichroski MJ, Robb GB, Rana TM. (2006) Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog*. 2 : e41.

Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D. (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci*. 118 : 981-992.

Wilusz C.J and Wilusz J. (2004) Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet*. 20 : 491-497.

Yamochi T, Ohnuma K, Hosono O, Tanaka H, Kanai Y, Morim C. (2008) SSA/Ro52 auto antigen interacts with Dcp2 to enhance its decapping activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 370 : 195-199.

Yang F, Peng Y, Murray EL, Otsuka Y, Kedersha N, Schoenberg DR. (2006b) Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1. *Mol Cell Biol*. 26 : 8803-8813.

Yang WH and Bloch DB. (2007) Probing the mRNA processing body using protein microarrays and "autoantigenomics". *RNA*. 13 : 704-712.

Yang WH, Yu JH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB. (2006a) RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA*. 12 : 547-554.

Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathiou T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK. (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci*. 117 : 5567-5578.

Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, O'Malley BW. (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol. Cell*. 25 : 765-778.

Yu JH, Yang WH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB. (2005) Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA*. 11 : 1795-1802.

Zalfa F, Eleuteri B, Dickson KS, Mercaldo V, De Rubeis S, di Penta A, Tabolacci E, Chiurazzi P, Neri G, Grant SG, Bagni C. (2007) A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci.* 10 : 578-587.

Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, Broadie K. (2001) Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell.* 107 : 591-603.

Zheng D, Ezzeddine N, Chen CY, Zhu W, He X, Shyu AB. (2008) Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 182 : 89-101.

Zhu CH, Kim J, Shay JW, Wright WE. (2008) SGNP : an essential Stress Granule/Nucleolar Protein potentially involved in 5.8s rRNA processing/transport. *PloS One.* 3:e3716.