Nancy-Université
Université Henri Poincaré

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

par **Nathalie PIAZZON**

Rôle du complexe de Survie des MotoNeurones (SMN) dans la biogenèse des particules ARN-Protéines

Soutenance publique le 13 novembre 2008

Membres du jury :		
Président du jury :	Mr Rémy BORDONNE	Directeur de recherche CNRS, Montpellier
Rapporteurs :	Mme Barbara BARDONI	Directeur de recherche INSERM, Valbonne
	Mr Rémy BORDONNE	Directeur de recherche CNRS, Montpellier
Examinateurs :	Mme Suzie LEFEBVRE	Chargée de recherche INSERM, Paris
	Mr Hervé MOINE	Chargé de recherche CNRS, Strasbourg
Directeur de thèse :	Mme Christiane BRANLANT	Directeur de recherche CNRS, Nancy
	Melle Séverine MASSENET	Chargée de recherche CNRS, Nancy

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP Nancy 1
Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

par **Nathalie PIAZZON**

Rôle du complexe de Survie des MotoNeurones (SMN) dans la biogenèse des particules ARN-Protéines

Soutenance publique le 13 novembre 2008

Membres du jury :		
Président du jury :	Mr Rémy BORDONNE	Directeur de recherche CNRS, Montpellier
Rapporteurs :	Mme Barbara BARDONI	Directeur de recherche INSERM, Valbonne
	Mr Rémy BORDONNE	Directeur de recherche CNRS, Montpellier
Examinateurs :	Mme Suzie LEFEBVRE	Chargée de recherche INSERM, Paris
	Mr Hervé MOINE	Chargé de recherche CNRS, Strasbourg
Directeur de thèse :	Mme Christiane BRANLANT	Directeur de recherche CNRS, Nancy
	Melle Séverine MASSENET	Chargée de recherche CNRS, Nancy

Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP Nancy 1
Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Christiane Branlant, Directeur de l'UMR CNRS-UHP 7567 pour m'avoir accueillie dans son équipe et permis de réaliser ce travail dans d'agréables conditions. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et les conseils qu'elle m'a donnés. Je la remercie aussi pour son aide précieuse dans la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mademoiselle Séverine Massenet pour m'avoir accueillie dans son groupe. Je la remercie aussi pour m'avoir guidée au cours de ce travail et m'avoir permis d'en tirer toujours le meilleur parti. Elle su me communiquer son enthousiasme, sa rigueur et m'a transmis son expertise en biologie moléculaire et cellulaire. Je la remercie également que pour le temps qu'elle m'a accordée tout au long de ma thèse.

Je remercie également l'AFM qui a toujours soutenu financièrement notre projet mais aussi ma dernière année de thèse.

Je tiens aussi à remercier les Docteurs Barbara Bardoni et Remy Bordonné pour avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué au cours de ma thèse. Je remercie aussi vivement les Docteurs Suzie Lefebvre et Hervé Moine qui ont accepté de juger mon travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Florence Rage, Agnès Méreau et Hervé Moine pour le travail de collaboration que nous avons réalisé ensemble.

Un immense merci à Florence pour sa précieuse et efficace collaboration. Merci de m'avoir suivi tout au long de ces années, merci pour ton enthousiasme, ta détermination, et tes idées. Merci de la confiance que tu m'as accordée. Merci aussi pour ta gentillesse, ta patience et ton expérience.

Merci à Virginie pour m'avoir initiée aux techniques d'analyses des structures secondaires d'ARN et merci à Antoine pour ses conseils avisés et expérimentés !

Un grand merci à Sylvain pour ce côte à côte de 4 ans. Merci de m'avoir supportée toutes ces années et rendu nos longues journées plus plaisantes ! Merci pour ta bonne humeur et bonne chance pour ta fin de thèse. Rendez-vous dans l'arène de la Brute !

Merci à Denise, Christophe et Fabrice pour tous les bons moments passés ensemble dans et hors du labo ! Je n'oublierai pas nos déjeuners pizzas et nos petites pauses café dans l'atrium !

J'ai une pensée toute particulière pour Jacky qui nous a malheureusement quittée trop tôt. Tu tenais une place importante dans le laboratoire et tu étais toujours disponible pour moi. Tu m'as accompagnée une bonne partie de ma thèse, ton amitié et ta volonté me manquent.

Un grand merci aussi à tous les membres de l'équipe Maturation des ARN ! Je tiens notamment à remercier Christelle et Véronique pour toutes les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues ensemble. Merci pour tous vos conseils. Merci aussi à Gaby pour sa joie de vivre.

Un grand merci aussi à Alexandra pour son soutien. Bon courage pour la suite ! Merci aussi à Alan, Magali, Nico, Benjamin, Anne et tous les autres, merci pour tous les bons moments passés ensemble et à très bientôt ! Merci à tous pour votre sympathie.

Je tiens aussi à remercier Karine pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Enfin, je voudrais terminer en remerciant très affectueusement ma famille pour m'avoir soutenue tout au long de ce projet.

82-FIP : 82kDa-FMRP Interacting Protein
AA : acide aminé
Actine G : Actine Globulaire
Actine F : Actine Fibrillaire
aDMA : asymetrical DiMethyl Arginine (arginine diméthylée asymétriquement)
Amp : ampicilline
AMPA : α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid
APP : Amyeloid Precursor Protein
APRA : Antibody-Positionned RNA Amplification
Arc : Activity-regulated cytoskeleton associated protein
ASK-1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase-1
BC1 : Brain Cytoplasmic RNA 1
BC200 : Brain Cytoplasmic RNA 200-nt
BSA : Bovine Serum Albumine
CaMKII : Calcium-calmodulinedependent Kinase II
CB : Cajal Body
CBC : Cap Binding Complex (complexe de fixation à la coiffe)
CBP : Cap Binding Protein (protéine de fixation à la coiffe)
CIP : Calf Intestine Phosphatase
CMCT : 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métha-p-toluène
CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CRM1 : Chromosome Maintenance Region-1
CYFIP1/2 : CYtoplasmic FMRP Interacting Protein
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMS : diméthyl sulfate
DMSO : diméthyl sulfoxyde
db/sb : double brin/simple brin
DTT : dithiothréitol
EBNA : Epstein-Barr nuclear antigen 2
EDTA : éthylène diamine tétraacétate
EF-1A : Elongation Factor-1A
eIF : eukaryotic translation Initiation Factor
ESE : Exonic Splicing Enhancer (séquence activatrice d'épissage)
ESS : Exonic Splicing Silencer (séquence inhibitrice d'épissage)
ex7 : exon 7
FBP : Fuse Binding Protein
FBS : Fetal Bovine Serum
FGF-2 : Fibroblast Growth Factor 2
Fig. : Figure
FMR1 : Fragile X Mental Retardation 1, gène humain
Fmr1 : Fragile X Mental Retardation 1, gène murin
FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein (protéine impliquée dans le syndrome de l'X fragile)
FRAXA : FRAgile chromosome X site A
FXR1/2 : Fragile X Related gene 1,2
FXR1/2P : Fragile X Related Protein 1,2
Gems : Gemini of coiled bodies

GFP : Green Fluorescent Protein
GST : Gluthatione S-Transférase
hnRNP : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
Hyg. : hygromycine
IGC : Interchromatine Granule Cluster
IMP1 : Insulin-like Growth Factor II mRNA binding protein 1
Iso1 : isoforme 1 de FMRP codée par l'ensemble des 12 exons
Iso7 : isoforme 7 de FMRP dépourvue de l'exon 12
JBP1 : Janus kinase Binding Protein 1
kb : kilobase
kD : kilodalton
Ke : kéthoxal
KH : K Homology
KSRP : KH type Splicing Regulatry Protein
LB/ LBA : Luria Broth/ Luria Broth supplémenté en ampicilline
LDP : Long Term Depression
LTP : Long Term Potentiation
$m^{2,2,7}G$: 2, 2, 7-triméthyl guanosine
$m^{7}G$: 7-méthyl guanosine
MAP1B : Microtubules Associated Protein 1B
mGlu-R : metabotropic Glutamate Receptor
MSP58 : MicroSPhérule 58
NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NDF : N-terminal Domain of FMRP
NES : Nuclear Export Signal
NFAR-2 : Nuclear Factor Associated with dsRNA
NLS : Nuclear Localisation Signal
NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
NoLS : Nucleolar Localisation Signal
NPC : Nuclear Pore Complex (complexe de pore nucléaire)
nt : nucléotides
NUFIP : NUclear FMRP Interacting Protein
NXF : Nuclear eXport Factor
OH : groupement hydroxyle
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man
ORF : Open Reading Frame (phase ouverte de lecture)
ORI : origine de réplication
PABP : PolyA Binding Protein
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PEG : polyéthylène glycol
PFNI/II : Profiline I,II
PHAX : Phosphorylated adaptator of RNA export
PNK : PolyNucléotide Kinase
PPP4 : Protein Phosphatase 4
PRMT5 : Protein Arginine MethylTransferase 5

PSD-95 : Post-Synaptic Density 95 Protein
Purα, β : Purine-rich element-binding protein α, β
Rac 1 : Ras-related C3 botulinium toxine substrate
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RFP : Red Fluorescent Protein
RGG : Boîte riche en arginines et glycines
Rho GTPase : Ras homolog Guanosine Triphosphatase
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RRM : RNA recognition motif
RNase : ribonucléase
RNasin : inhibiteur de ribonucléases
RNG 10S : RNA granule 10S
RNP : RiboNucléoParticule/complexe ribonucléoprotéique
RT : transcriptase inverse (Reverse Transcriptase)
scaRNA : Small Cajal body-specific RNA (petit ARN spécifique des Corps de Cajal)
sDMA : symetrical DiMethyl Arginine (arginines diméthylées symétriquement)
SDS : sodium dodécylsulfate
SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SF-1 : Steroidogenic Factor-1
SIP-1 : SMN Interacting protein-1
SMA : Spinal Muscular Atrophy (amyotrophie spinale)
SMN : Survival of Motor Neuron (survie des motoneurones)
SMN : Gène humain de survie des Motoneurones
Smn : Gène murin de survie des Motoneurones
snoRNA : Small nucleolar RNA (petit ARN nucléolaire)
SRP : Signal Recognition Particule (particule de reconnaissance du signal)
TBE : Tampon Tris-borate-EDTA
TE : Tampon Tris-EDTA
TGS1 : TriméthylGuanosine Synthase 1
TRE : Tetracycline Response Element (élément de réponse à la tétracycline)
Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane
UNR : Upstream of N-Ras
UsnRNA : U rich small nuclear RNA (petit ARN nucléaire riche en U)
UsnRNP : U rich Small Ribonucleoprotein Particle (petite particule ribonucléoprotéique nucléaire)
UTR : Unstranslated Region
UV : Ultra-Violet
YB1/P50 : Y-box-binding protein 1
ZBP1/2 : Zing code Binding Protein 1, 2
ZPR1 : Zinc finger Protein1

Ne sont pas incluses dans ce tableau (a) **les abréviations internationales utilisées pour désigner les acides aminés** (nomenclature à 3 lettres ou à une lettre), ni (b) **les abréviations internationales des unités de mesure** (ml, mg, s, h, etc.) ni (c) **celles de certains composants de la substance vivante** (ATP, RNA, DNA, mRNA, etc.) pour lesquels l'abréviation internationalement acceptée a été gardée. Pour certaines substances (facteurs de croissance, cytokine, etc.), l'abréviation anglaise internationalement utilisée a été retenue.

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Structure du locus SMA **p7**

Figure 2 : Différences de séquence primaire et d'épissage entre les transcrits *SMN1* et *SMN2* **p9**

Figure 3 : Modèle de régulation de l'épissage de l'exon 7 **p10**

Figure 4 : Génotypes observés chez la plupart des patients atteints de SMA **p12**

Figure 5 : Cibles potentielles pour la thérapie de la pathologie SMA **p20**

Figure 6 : Inclusion de l'exon 7 par stratégies non pharmacologiques **p23**

Figure 7 : Séquence et domaines fonctionnels de la protéine SMN **p27**

Figure 8 : Modèle schématique de l'architecture de la protéine SMN sous forme dimérisée (A) et oligomérisée (B) **p29**

Figure 9 : Les Gems : de structures nucléaires liées aux CB **p31**

Figure 10 : Représentation schématique du complexe SMN **p38**

Figure 11 : Représentation schématique du cycle d'épissage par le spliceosome **p40**

Figure 12 : Séquences et structures secondaires des UsnRNA humains majeurs **p42**

Figure 13 : Organisation structurale du complexe formé par les protéines Sm **p43**

Figure 14 : Biogenèse des UsnRNP **p45**

Figure 15 : Modifications post-traductionnelles des protéines Sm **p49**

Figure 16 : Assemblage des protéines Sm par le complexe SMN-PRMT5 **p51**

Figure 17 : Implication des protéines Gemin 6/7 dans le recrutement des protéines Sm au complexe SMN **p52**

Figure 18 : Régions des snRNA spliceosomaux U1, U2, U4 et U5 nécessaires à leur interaction avec le complexe SMN **p54**

Figure 19 : Caractéristiques des séquences d'ARN minimales permettant la fixation au complexe SMN et l'association aux protéines Sm **p56**

Figure 20 : Implication du complexe SMN dans la biogenèse des complexes UsnRNP spliceosomales **p57**

Figure 21 : Modèle schématique représentant l'architecture du complexe Sm/Lsm de la snRNP U7 **p62**

Figure 22 : Composition et organisation des complexes snoRNP **p64**

Figure 23 : Assemblage des snoRNP **p67**

Figure 24 : Ordre d'assemblage des protéines sur les snoRNP H/ACA **p70**

Figure 25 : Conséquences possibles d'un défaut de UsnRNP dans la pathologie SMA **p72**

Figure 26 : Transport des ARNm dans les neurones **p79**

Figure 27 : Localisation des protéines SMN et Gemin 2 dans des granules distribués dans les axones en développement et dans les cônes de croissance **p83**

Figure 28 : Classification des allèles de *FMR1* en fonction de la longueur de la série de triplets *CGG* **p90**

Figure 29 : Organisation du gène *FMR1* humain **p92**

Figure 30 : Isoformes de FMRP **p94**

Figure 31 : Comparaison structurale des membres de la famille des FXR **p97**

Figure 32 : Structure des quartets de guanines et du « kissing complex » **p99**

Figure 33 : Implication de la protéine FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : émergence du modèle des récepteurs au glutamate **p109**

Figure 34 : Structure secondaire de l'ARN BC1 de souris (A) et modèle de structure secondaire de l'ARN BC200 basé sur la structure secondaire de l'ARN 7S (B) **p111**

Figure 35 : Schéma de l'interaction du domaine 3' de l'ARN BC1 avec les facteurs eIF4A et eiF4B et la protéine PABP responsable de la répression de l'initiation de la traduction par l'ARN BC1 **p115**

Figure 36 : Modèle proposé pour expliquer une répression traductionnelle des ARNm médiée par le complexe ARN BC1/BC200-FMRP **p118**

Figure 37 : Comparaison des structures secondaires des ARN 7S d'eucaryotes et leurs homologues d'archae et de bactéries **p121**

Figure 38 : Représentation schématique de l'organisation de la particule SRP des mammifères (A/) et de la structure secondaire du domaine Alu de l'ARN 7S (B/) **p123**

Figure 39 : Modèle proposé pour l'assemblage des protéines SRP avec l'ARN 7S **p127**

Figure 40 : L'adressage des protéines au réticulum endoplasmique par la particule SRP : un mécanisme d'insertion co-traductionnelle des protéines **p129**

Matériels et Méthodes

Figure 41 : La cartographie des ARN en solution **p146**

Figure 42 : Principe de la cartographie chimique ou enzymatique des ARN **p150**

Résultats

Figure 43 : Le système Tet-Off et les plasmides utilisés pour l'établissement de la lignée stable **p169**

Figure 44 : Purification du complexe SMN **p171**

Figure 45 : Interaction *in vitro* de la protéine SMN produite chez *E. coli* et de la protéine FMRP immobilisée sur billes **p173**

Figure 46 : La méthylation de la protéine FMRP n'est pas importante pour son interaction avec la protéine SMN **p175**

Figure 47 : Les 3 protéines de la famille des FXR interagissent *in vitro* avec la protéine SMN **p192**

Figure 48 : Une fraction de protéines SMN dans les polyribosomes **p199**

Figure 49 : Représentation schématique du rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage et l'export des mRNP associées à FMRP, dans les neurones **p199**

Figure 50 : L'ARN BC200 se fixe au complexe SMN en reconnaissant des éléments au sein du complexe différent de ceux reconnus par les snRNA U1, U4 et U5 **p204**

Figure 51 : Modèles de structure secondaire proposés pour l'ARN BC200 **p207**

Figure 52 : Analyse expérimentale de la structure 2D du domaine Alu de l'ARN BC200 (positions 1 à 120 de l'ARN BC200) **p211**

Figure 53 : Représentation schématique de nos données expérimentales sur les différent modèles proposés pour l'ARN BC200 **p212**

Figure 54 : Analyse expérimentale de la structure 2D de l'extrémité 3' de l'ARN BC200 **p215**

Figure 55 : L'ARN BC200 sauvage et les mutant que nous avons produits **p217**

Figure 56 : Identification des domaines de l'ARN BC200 permettant sa fixation au complexe SMN purifié **p218**

Figure 57 : Identification de la région de l'ARN BC200 protégée contre l'action des RNases au sein du macro-complexe ARN BC200/complexe SMN **p220**

Figure 58 : Identification des domaines de fixation de l'ARN BC200 au complexe SMN par hydrolyse alcaline **p222**

Figure 59 : Recherche par RT-PCR d'une interaction entre l'ARN BC200 et le complexe SMN dans des extraits de cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y) **p224**

Figure 60 : Représentation schématique des 3 motifs ARN se fixant au complexe SMN **p227**

Figure 61 : Sondes prévues pour les tests de localisation des ARN BC1 et BC200 *in cellulo* **p230**

Figure 62 : La protéine hnRNP-A2 recombinante interagit, *in vitro,* avec les ARN BC1 et BC200 **p235**

Figure 63 : Une séquence similaire au motif A2RE de l'ARNm de MBP est présente dans l'ARN BC200 **p237**

Figure 64 : Recherche du ou des domaines de fixation de la protéine hnRNP-A2 sur l'ARN BC200 **p238**

Figure 65 : L'absence du domaine 3' terminal de l'ARN BC200 diminue l'affinité de cet ARN pour la protéine hnRNP-A2 **p240**

Figure 66 : L'ARN 7S se fixe sur le complexe SMN purifié **p245**

Figure 67 : Recherche d'une interaction entre les protéines SRP9 et 19 et les protéines du complexe SMN **p238**

Figure 68 : Interaction de l'ARN 7S injecté dans les oocytes de *X. laevis* avec les protéines du complexe SMN **p241**

Figure 69 : Principe de la technique de double hybride **p247**

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I : Principales mutations du gène *SMN1* décrites chez les patients atteints d'amyotrophie spinale **p14**

Tableau II : Organismes manipulés afin de reproduire la pathologie SMA de l'homme **p15**

Tableau III : Caractéristiques des composants du complexe SMN **p34**

Tableau IV : Les protéines du complexe SMN interagissent avec un grand nombre de partenaires transitoires **p36 et 37**

Tableau V: Composition en protéines des différents types de granules à ARN isolés par plusieurs équipes **p76 et 77**

Tableau VI : Les partenaires protéiques de la protéine FMRP **p103**

Tableau VII : Caractéristiques des protéines SRP constituant la particule SRP **p125**

Matériels et Méthodes

Tableau VIII : anticorps primaires (A/) et secondaires (B/) utilisés au cours de ce travail **p141**

Tableau IX : oligonucléotides utilisés pour les expériences de RT-PCR **p160**

REMERCIEMENTS

ABREVIATIONS

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 2

Chapitre I : L'amyotrophie spinale et le complexe SMN 3

I/ L'amyotrophie spinale 3

1/ Les amyotrophies spinales : caractéristiques cliniques et pathologiques 3

2/ Les bases génétiques des SMA 6

2.1/ Le locus SMA 6

2.2/ Les gènes *SMN1* et *SMN2* 8

2.3/ La SMA : un défaut de protéine SMN 11

3/ Modèles animaux d'amyotrophie spinale 13

3.1/ Les modèles murins (*Mus musculus*) 13

3.2/ La drosophile (*Drosophila melanogaster*) 17

3.3/ Le poisson zèbre (*Danario rerio*) 17

3.4/ Les autres modèles 18

4/ Stratégies thérapeutiques 19

4.1/ Activation du gène *SMN2* : les inhibiteurs d'histones déacétylases et les autres composés chimiques 19

4.2/ Inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu du gène *SMN2* 22

4.3/ Stabilisation de la protéine SMN et augmentation de sa traduction à partir du gène *SMN2* 25

4.4/ Neuroprotection..... 25

4.5/ Thérapie génique et remplacement cellulaire..... 26

II/ Le complexe SMN et sa localisation cellulaire..... 26

1/ Présentation de la protéine SMN..... 26

1.1/ Les domaines fonctionnels de la protéine SMN..... 28

1.2/ Localisation et expression de la protéine SMN..... 30

2/ Composition du complexe SMN..... 32

2.1/ Caractéristiques des protéines du complexe SMN..... 32

2.2/ Structure et organisation du complexe SMN..... 35

III/ Rôles ubiquitaires du complexe SMN..... 39

1/ Rôle du complexe SMN dans l'assemblage des UsnRNP..... 39

1.1/ Biogenèse des pré-UsnRNP..... 39

1.1.1/ La réaction d'épissage..... 39

1.1.2/ Transcription et export des UsnRNA néo-synthétisés..... 44

1.1.3/ Assemblage et ré-import dans le noyau des complexes pré-UsnRNP..... 44

1.2/ Implication du complexe SMN dans ce processus..... 47

1.2.1/ Le complexe SMN interagit à la fois avec les protéines Sm et les UsnRNA..48

1.2.2/ Le complexe SMN pourrait jouer le rôle de chaperon dans la biogenèse des UsnRNP..... 58

2/ Rôle du complexe SMN dans l'assemblage de particules ribonucléoprotéiques autres que les UsnRNP..... 60

2.1/ Implication du complexe SMN dans l'assemblage d'autres RNP contenant les protéines Sm et Lsm..... 60

2.1.1/ Les UsnRNP mineures..... 60

2.1.2/ Les HSUR..... 60

2.1.3/ La particule U6..... 61

2.1.4/ La particule U7..... 61

2.2/ Rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage des snoRNP 63

2.2.1/ Les complexes snoRNP..... 63

2.2.2/ Biogenèse des snoRNP chez les eucaryotes..... 65

IV/ Liens entre la fonction du complexe SMN et la pathologie SMA 71

1/ La SMA : un défaut d'assemblage des UsnRNP ?..... 71

2/ La SMA : une fonction spécifique de la protéine SMN et/ou du complexe SMN ?..... 75

2.1/ Un rôle dans le transport des ARNm ?..... 75

2.1.1/ Le transport des ARNm et le mécanisme de traduction localisée..... 75

2.1.2/ Rôle de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans le transport des ARN ?..... 82

2.2/ La protéine SMN axonale : a-SMN..... 86

2.3/ La protéine SMN et la dynamique de l'actine..... 87

2.4/ La protéine SMN dans les muscles..... 88

Chapitre II : *Le syndrome de l'X fragile, la protéine FMRP absente*..... 89

I/ Le Syndrome de l'X Fragile : des causes génétiques aux causes moléculaires.. 89

1/ Le syndrome de l'X fragile : une maladie monogénique à expansion de triplets nucléotidiques..... 89

2/ Le gène *FMR1*..... 91

2.1/ Caractéristiques générales..... 91

2.2/ L'épissage du gène *FMR1*..... 91

3/ Le syndrome de l'X fragile et la protéine FMRP..... 93

4/ Les gènes homologues *FXR1/FXR2*..... 95

II/ FMRP : une protéine de liaison aux ARN..... 96

1/ Les domaines fonctionnels de la protéine FMRP..... 96

1.1/ Les domaines de liaison aux ARN..... 96

1.2/ Les domaines d'homo et d'hétérodimérisation.....98

2/ Les motifs de liaison à l'ARN.....98

3/ Les cibles ARN de la protéine.....100

4/ FMRP et les granules à ARN dans les neurones..... 101

III/ Principaux interactants de la protéine FMRP..... 102

IV/ Fonctions de la protéine FMRP..... 102

1/ FMRP et régulation de la traduction..... 102

2/ FMRP et le transport des ARNm.....106

3/ Régulation de la synthèse protéique dans les neurones..... 107

3.1/ Régulation de la synthèse protéique dans les axones..... 107

3.2/ Régulation de la synthèse protéique au niveau des synapses.....107

Chapitre III : Les ARN neuronaux BC1 et BC200..... 110

I/ Caractéristiques des ARN neuronaux BC1 et BC200..... 110

1/ Origine et structure..... 110

2/ Les protéines associées aux ARN BC1 et BC200..... 112

2.1/ Les protéines communes aux ARN BC1 et BC200..... 112

2.2/ Les protéines spécifiques à l'ARN BC1..... 113

2.3/ Les protéines spécifiques à l'ARN BC200..... 114

3/ Localisation cellulaire des ARN neuronaux BC1 et BC200..... 116

II/ Rôles des ARN neuronaux BC1 et BC200..... 116

1/ Contrôle direct de la traduction par inhibition de l'initiation..... 116

2/ Contrôle indirect de la traduction en lien avec la protéine FMRP.....117

3/ Rôle possible de l'ARN BC1 dans la transmission du signal par les récepteurs D2 à la dopamine..... 119

Chapitre IV : La particule SRP.....120

I/ Structure et composition de la particule SRP..... 120

1/ L'ARN 7S..... 120

2/ Les protéines SRP..... 122

II/ Assemblage de la particule SRP..... 126

III/ L'adressage des protéines par la particule SRP..... 128

1/ La reconnaissance du peptide signal par la particule SRP..... 128

2/ Interaction avec le récepteur SR..... 130

OBJECTIFS.....132

MATERIELS ET METHODES.....135

I/ Matériels..... 136

1/ Souches et plasmides utilisés..... 136

1.1/ Les souches *E. coli*..... 136

1.2/ Les cellules d'organismes eucaryotes.....136

1.3/ Les plasmides utilisés..... 137

1.3.1/ Plasmides recombinants utilisés pour la production d'ARN *in vitro*.....137

1.3.2/ Plasmides utilisés pour la production d'une lignée de cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2..... 137

1.3.3/ Plasmides recombinants utilisés pour la production de protéines *in vitro* et *in cellulo*..... 137

2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant..... 140

3/ Anticorps..... 140

II/ Méthodes..... 140

1/ Culture cellulaire et technique de transfection..... 140

1.1/ Le milieu de culture..... 140

1.2/ La technique de transfection..... 140

2/ Génération d'une lignée de cellules HeLa Tet-Off exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2..... 140

3/ Purification des complexes SMN..... 142

3.1/ Principe..... 142

3.2/ Analyse par coloration à l'argent..... 143

4/ Techniques d'analyse par empreintes enzymatiques et chimiques..... 143

4.1/ Préparation des ARN..... 143

4.2/ Analyse de la structure secondaire d'un ARN en solution par utilisation de sondes enzymatiques..... 145

4.3/ Analyse de la structure secondaire d'un ARN en solution par utilisation de sondes chimiques..... 151

4.4/ Recherche de modèles de structure secondaire : utilisation du logiciel Mfold..... 152

5/ Production de protéines recombinantes et analyse des interactions proteines/protéines *in vitro*..... 153

5.1/ Production de protéines recombinantes chez *E. coli*..... 153

5.2/ Production de protéines recombinantes dans un lysat de réticulocytes de lapin ou dans un extrait d'*E. Coli*..... 155

5.3/ Analyse *in vitro* des interaction protéines/protéines..... 155

6/ Techniques d'analyse des interactions ARN/protéine(s)..... 156

6.1/ Analyses de complexes ARN/protéines par expérience de retard sur gel.. 156

6.2/ Analyses des interactions ARN/complexe SMN..... 157

6.2.1/ Analyses à partir du complexe SMN purifé..... 157

6.2.2/ Analyses par RT-PCR..... 158

6.2.3/ Technique de micro-injection dans les oocytes de *X. Laevis*..... 161

RESULTATS-PERSPECTIVES..... 164

Chapitre I : Mise en évidence et caractérisation d'une interaction entre le complexe SMN et la protéine FMRP..... 165

I/ Intérêt de l'étude dans le contexte actuel des connaissances 165

II/ Stratégie utilisée pour étudier l'interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN..... 166

1/ Recherche de l'association du complexe SMN avec la protéine FMRP dans des extraits de cellules neuronales..... 166

2/ Mise en évidence d'une co-localisation partielle entre les protéines SMN et FMRP dans des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture..... 167

3/ Etude de l'interaction entre le complexe SMN purifié avec la protéine FMRP recombinante..... 168

3.1/ Etablissement d'une lignée cellulaire stable pour la purification du complexe SMN..... 168

3.2/ Purification du complexe SMN et test d'association à la protéine FMRP... 169

4/ Identification de la protéine du complexe SMN interagissant avec la protéine FMRP..... 173

5/ Identification des domaines des protéines SMN et FMRP impliqués dans l'interaction..... 173

Article..... 177

"*In vitro* and *in cellulo* evidences for association of the Survival of Motor Neuron complex with the Fragile X Mental Retardation Protein".

N. Piazzon, F. Rage, F. Schlotter, H. Moine, C. Branlant et S. Massenet

III/ Résultats complémentaires 192

1/ La protéine SMN s'associe, *in vitro*, avec les protéines FXR1P et FXR2P.....192

2/ Une petite fraction de protéines SMN co-sédimente avec la protéine FMRP dans les fractions correspondant aux polyribosomes..... 192

IV/ Conclusions et perspectives de cette étude..... 195

1/ Analyse des granules neuronaux contenant la protéine SMN..... 196

2/ Rôle possible de la protéine SMN dans le transport et/ou la formation des mRNP contenant la protéine FMRP..... 198

3/ Rôle possible de la protéine SMN dans la régulation de la traduction des ARNm dépendante de la protéine FMRP..... 200

Chapitre II : Caractérisation des interactions de l'ARN neuronal BC200 avec le complexe SMN et la protéine hnRNP-A2..... 202

A/ Mise en évidence et caractérisation des capacités d'interaction de l'ARN neuronal BC200 avec le complexe SMN..... 202

I/ Intérêt de l'étude..... 202

II/ Résultats obtenus 203

1/ Etude in vitro des capacités d'interaction de l'ARN BC200 avec le complexe SMN..... 203

1.1/ Mise en évidence d'une interaction *in vitro*..... 203

1.2/ L'ARN BC200 n'entre pas en compétition avec les UsnRNA pour sa fixation au complexe SMN.....203

2/ Etude expérimentale de la structure secondaire de l'ARN BC200 *in vitro* ...206

2.1/ Stratégie expérimentale.....206

2.2/ Analyse de la structure 2D de la région correspondant aux nt 1 à 120....209

2.3/ Analyse de la structure 2D de la région 3' terminale.....214

3/ Recherche des domaines de l'ARN BC200 requis pour son interaction avec le complexe SMN *in vitro*..... 216

3.1/ Analyse des capacités d'interaction des mutants de l'ARN BC200 avec le complexe SMN purifié.....216

3.2/ Identification de la région de l'ARN BC200 protégée par le complexe SMN.....219

3.3/ Recherche d'une interaction entre le complexe SMN et l'ARN BC200 *in cellulo* 221

III/ Conclusions et perspectives.....225

1/ La structure secondaire de l'ARN BC200 et ses domaines d'interaction avec le complexe SMN.....225

2/ Les UsnRNA et l'ARN BC200 n'ont pas le même mode de fixation au complexe SMN.....226

3/ Quel pourrait être le lien possible entre l'ARN BC200 et le complexe SMN ?.....228

3.1/ Existe-t-il un lien biologique entre l'ARN BC200 et le complexe SMN ?...228

3.2/ Rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage de la RNP BC200.....231

3.3/ Rôle possible du complexe SMN dans la fonction de la RNP BC200..... 232

***B/ Mise en évidence et caractérisation de la mise en place d'une interaction entre l'ARN BC200 et la protéine hnRNP-A2*.....233**

I/ Intérêt de l'étude..... 233

II/ Résultats obtenus..... 233

1/ Mise en évidence des capacités d'interaction de l'ARN BC200 avec la protéine hnRNP-A2 *in vitro*..... 233

2/ Recherche du ou des site(s) de reconnaissance de la protéine hnRNP-A2 sur l'ARN BC200..... 234

III/ Conclusions et perspectives.....239

1/ Comment la protéine hnRNP-A2 interagit-elle avec l'ARN BC200 ?.....239

2/ Rôle fonctionnel possible de la fixation de la protéine hnRNP-A2 à l'ARN BC200 *in vivo* 241

Chapitre III : Mise en évidence et caractérisation d'une interaction entre le complexe SMN et la particule SRP.....243

I/ Intérêt de l'étude.....243

II/ Stratégie utilisée et résultats obtenus..... 243

1/ Test d'interaction entre l'ARN 7S et le complexe SMN purifié..... 244

2/ Test d'une interaction entre le complexe SMN et l'ARN 7S *in cellulo*.....248

3/ Utilisation de l'approche basée sur la micro-injection dans les oocytes de *X. laevis* 250

3.1/ Etude de l'interaction entre le complexe SMN et l'ARN 7S.....250

3.2/ Importance possible du complexe SMN dans la mise en place de l'interaction entre la protéine SRP 54 et l'ARN 7S.....252

III/ Conclusions et perspectives.....255

1/ Le complexe SMN peut interagir in vitro et s'associe *in cellulo* avec l'ARN 7S.....255

2/ Importance possible du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP.....257

CONCLUSION GENERALE.....260

BIBLIOGRAPHIE.....263

Avant-propos

Pendant de nombreuses années, les ARN ont été considérés comme de simples intermédiaires entre l'ADN qui contient les gènes et les protéines. On sait maintenant que les ARN possèdent de nombreuses autres fonctions et interviennent à différent niveaux de la régulation de l'expression génique. Ces fonctions dépendent de l'établissement d'interactions ARN/protéines, qui gouvernent la formation des complexes ribonucléoprotéiques (complexes RNP). Ces complexes très dynamiques jouent un rôle majeur dans la transcription, dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle tels que l'épissage, la stabilité des ARN, le routage et la compartimentation des ARN. Ils interviendraient également lors de la traduction. En outre, la mise en évidence de différentes classes de petits ARN tels que les UsnRNA (*small nuclear RNA*), les ARNnc (*no codant RNA),* les snoRNA (*small nucleolar RNA*), les microARN, plus récemment les rasiRNA (*repeat associated small interfering RNA*), etc, ouvre la possibilité de nouvelles fonctions encore insoupçonnées des ARN.

L'intérêt pour la localisation des ARN, la compréhension de leurs modes d'action et l'évolution biologique de ces molécules ne cessent de croître. La localisation d'ARN spécifiques est un mécanisme largement utilisé lors du développement embryonnaire pour générer une distribution asymétrique des protéines dans l'embryon. Dans le système nerveux, la localisation des ARN joue un rôle très important à la fois durant le développement et dans l'organisme adulte. Les neurones sont le siège d'une intense circulation et les mécanismes de transport y sont particulièrement importants du fait de leur anatomie adaptée à l'échange d'informations à longue distance, ce qui leur confère des dimensions sans équivalent dans le monde cellulaire. Aujourd'hui, de plus en plus d'études suggèrent, d'ailleurs, que des défauts de trafic pourraient jouer un rôle important dans l'apparition de désordres neurologiques et notamment, le syndrome de l'X fragile, une des formes héréditaires les plus communes de retard mental et l'amyotrophie spinale, une maladie génétique responsable de mortalité infantile. Ces deux pathologies seront justement abordées dans cette présentation bibliographique en lien avec mon travail de thèse.

Introduction

Introduction

Chapitre I : L'amyotrophie spinale et le complexe SMN

I/ L'amyotrophie spinale

1/ Les amyotrophies spinales : caractéristiques cliniques et pathologiques

Chez l'homme, un déficit en protéine SMN conduit à une pathologie grave : l'amyotrophie spinale (ou SMA, *Spinal Muscular Atrophy*) (Lefebvre et al, 1995 ; Lefebvre et al, 1997). Les amyotrophies spinales progressives sont les maladies génétiques les plus graves du nouveau-né et du jeune enfant, puisqu'elles constituent l'une des causes de mortalité infantile la plus fréquente. Elles touchent indifféremment filles ou garçons dans toutes les régions du monde (Hausmanowa-Petrusewicz et al, 1968). On estime leur prévalence à 1 naissance sur environ 6.000 à 10.000 (Pearn, 1978 ; Pearn, 1980) et à environ 1 porteur sur 35 à 50 (McAndrew et al, 1997 ; Feldkotter et al, 2002 ; Cusin et al, 2003). Les amyotrophies spinales constituent un groupe de maladies neuromusculaires à transmission autosomique récessive. Elles sont caractérisées par une dégénérescence des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière entraînant une atrophie musculaire et conduisant finalement à la paralysie (pour revue, Nicole et al, 2002). La plupart des patients souffrant d'amyotrophie spinale présentent des signes cliniques de la maladie dès l'enfance. Il existe une forte corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de l'atteinte, de sorte que, plus la maladie commence précocement et moins le pronostic vital est favorable. C'est selon ce critère que les SMA infantiles ont été classées en 3 types (Pearn, 1978 ; Pearn, 1980 ; Munsat et al, 1990 ; Munsat & Davies, 1992 et pour revue, Wirth et al, 2006a).

(1) Le type I : maladie de Werdnig-Hoffmann ou amyotrophie spinale infantile sévère (OMIM #253300) (pour revues, Hirtz et al, 2005 ; Bach et al, 2003 ; Bach, 2007 ; Bach, 2007).

Ce type représente environ 35% de la totalité des amyotrophies spinales. Les effets de l'amyotrophie spinale de type I sont constatés pendant les 6 premiers mois de la vie et affectent souvent les enfant avant même la naissance. Les mères ont pu remarquer une diminution des mouvement du fœtus en fin de grossesse. Après quelques semaines ou mois de vie, on observe une grande faiblesse musculaire de l'enfant (hypotonie). Il ne peut pas tenir sa tête, rouler sur lui-même et s'asseoir seul. Les muscles qui permettent de téter et d'avaler peuvent être affectés d'où les difficultés de déglutition et d'alimentation. Leur intelligence est parfaitement normale. Leur sensibilité n'est pas atteinte. L'atteinte musculaire commence par la racine des membres (hanches et épaules) pour remonter jusqu'aux extrémités (pieds et mains). Le plus dangereux est l'atteinte des muscles du système respiratoire. La toux est faible et inefficace et la capacité à se défendre contre les affections respiratoires est réduite. Les difficultés respiratoires sont généralement la cause majeure du décès de ces enfant. La plupart des praticiens informent les parents au moment du diagnostic que les enfants atteints d'amyotrophie spinale de type I ne vivent pas plus de deux ans. Il y a pourtant de part le monde des enfants plus âgés, et même des adultes atteints d'amyotrophie spinale de type I. Les atteintes sont en effet très variables suivant les individus, et cette diversité rend toute certitude impossible quant à la durée de vie réelle d'un enfant atteint.

(2) Le type II : amyotrophie spinale infantile intermédiaire (OMIM #253550) (pour revue, Hirtz et al, 2005).

Ce type représente environ 45% de la totalité des amyotrophies spinales, c'est le plus courant. Les effets de l'amyotrophie spinale de type II sont généralement constatés entre l'âge de 6 mois et l'âge de 3 ans. On observe chez l'enfant une faiblesse et une atrophie de la masse musculaire. Le degré d'atteinte est très variable selon les individus. L'évolution de la maladie est lente et progresse par paliers. La faiblesse musculaire touche surtout les muscles des jambes et du tronc. La prédisposition aux affections respiratoires dépend de la manière dont les muscles respiratoires sont touchés. Généralement, il n'y a pas de difficultés ni pour avaler ni pour téter. Les enfants peuvent généralement s'asseoir et tenir leur tête. Ils

peuvent aussi se tenir debout. Mais ces capacités se réduisent au fur et à mesure qu'ils prennent du poids. Cependant, une bonne prise en charge orthopédique permet de réduire voire éviter les déformations de la colonne vertébrale et les rétractions tendineuses. L'espérance de vie d'un enfant atteint d'amyotrophie spinale de type II n'est pas réellement évaluable et dépend de l'atteinte musculaire et respiratoire. Le plus grand danger vient des affections respiratoires, pneumonie ou autres, contre lesquelles l'enfant combat difficilement.

(3) Le type III : maladie de Kugelberg-Welander ou amyotrophie spinale juvénile (OMIM #253400) (pour revue, Hirtz et al, 2005).

Ce type représente environ 8% de la totalité des amyotrophies spinales. Les effets de l'amyotrophie spinale de type III sont constatés vers l'âge de 3 ou 4 ans, parfois plus tard. On observe un affaiblissement musculaire entraînant une démarche dandinante plus ou moins gênante. Le réflexe rotulien (du genou) est absent. Les enfants peuvent s'asseoir, marcher et se tenir debout, mais ces capacités diminuent avec la prise de poids. La sensibilité et les fonctions mentales ne sont pas atteintes. Il peut y avoir des déformations de la colonne vertébrale conduisant à une scoliose plus ou moins prononcée. Une bonne prise en charge orthopédique permet de réduire voire d'éviter ces déformations pouvant avoir une influence sur les fonctions respiratoires. L'espérance de vie d'un enfant n'est généralement pas affectée par une amyotrophie spinale de type III, car, dans la plupart des cas, il n'y a pas d'atteinte respiratoire.

Chez certains patients, les signes cliniques apparaissent plus tardivement et sont de moindre intensité, on parle alors d'**amyotrophie spinale adulte de type IV** (OMIM #271150) (pour revue, Sumner, 2006). Dans ce cas, on observe une paralysie progressive des muscles des membres inférieurs et en conséquence une atrophie de ces muscles. Les muscles des cuisses et des avant-bras s'affaiblissent. Dans certains cas, il peut y avoir une atteinte respiratoire. Généralement, la progression de la maladie est assez rapide après le début des symptômes, mais l'espérance de vie n'est pas mise en cause.

Aujourd'hui cette classification est toujours utilisée, mais elle n'est pas toujours adaptée à la réalité de la maladie. Au sein d'un même groupe, il faut savoir que le profil évolutif est très variable d'un individu à l'autre.

2/ Les bases génétiques des SMA

2.1/ Le locus SMA

En 1990, des expériences de clonage positionnel du gène impliqué dans les SMA ont permis d'identifier une région chromosomique associée à cette maladie. Cette région est située sur le bras long du chromosome 5, dans la région q11.2-13.3 ***(Figure 1)*** (Brzustowicz et al, 1990 ; Gilliam et al, 1990 ; Melki et al, 1990b ; Melki et al, 1990a). Chez l'homme, le *locus* SMA est situé dans une région génomique très complexe qui contient des séquences répétitives, des pseudogènes et des séquences analogues à des transposons. Ces observations suggèrent qu'il s'agit d'une région très instable (Francis et al, 1993 ; Kleyn & Gilliam, 1993 ; Kleyn et al, 1993 ; Melki et al, 1994). Une caractérisation plus poussée a mis en évidence une région chromosomique particulière constituée d'une duplication inversée d'environ 500 kb dont chaque élément contient 4 gènes. Le gène *SMN* (*Survie des MotoNeurones*) (Lefebvre et al, 1995), le gène codant la protéine NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein)* (Roy et al, 1995), le gène codant la protéine p44, qui est une sous-unité du facteur de transcription TFIIH, et enfin le gène *H4F5*, dont la fonction est inconnue (Burglen et al, 1997 ; Scharf et al, 1998). Pour chacun de ces gènes une copie télomérique et une copie centromérique sont présentes ***(Figure 1)***. Chez l'homme, il existe donc deux gènes codant la protéine SMN : *SMN1* (OMIM #600354) et *SMN2* (OMIM #601627). La duplication est également retrouvée chez les primates (Rochette et al, 2001), cependant la copie *SMN2* est propre à l'homme. Par contre, chez toutes les autres espèces, un seul gène code la protéine SMN (pour revue, Paushkin et al, 2002).

Les plus petites délétions caractérisées chez les patients atteints de SMA ont permis d'identifier le gène *SMN* comme le gène dont la mutation entraîne la SMA (Lefebvre et al, 1995). Il se compose de 27 kb réparties en 9 exons qui sont retrouvés dans un ARNm de

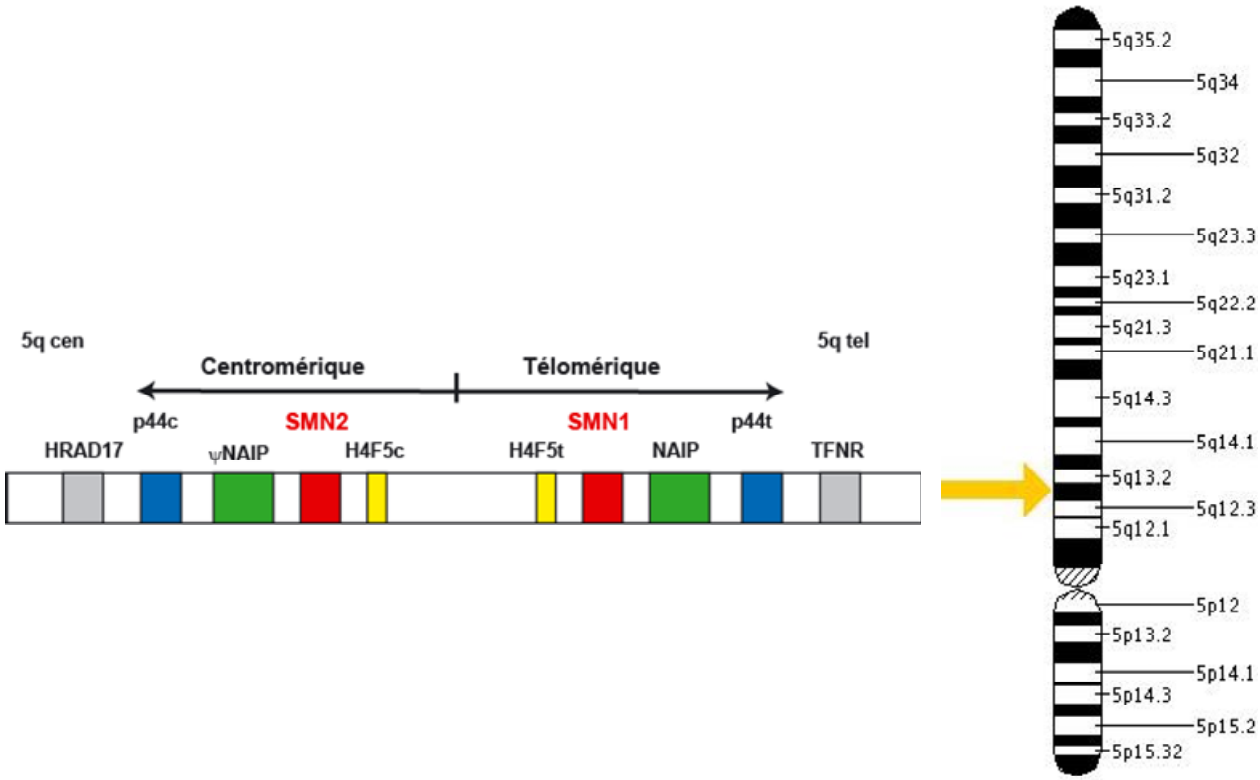


Figure 1 : Structure du locus SMA,

Le locus SMA est situé à l'extrémité centromérique du bras long du chromosome 5 en position 5q11.2-13.3. Le locus SMA contient les gènes *SMN1* et *2* dans une région dupliquée centromérique et télomérique. Cette région contient également trois autres gènes : *p44*, *NAIP* et *H4F5*. D'après Lefebvre et al, 1995.

1,7 kb (Burglen et al, 1996). Le codon stop est situé juste après l'exon 7, ainsi l'exon 8 est non codant. La copie télomérique du gène *SMN* appelée *SMN1* ou *SMNt* est absente chez 95% des patients atteints de SMA et elle présente des mutations faux-sens, non-sens ou encore des décalages du cadre de lecture chez les 5% restants (Lefebvre et al, 1995). La copie centromérique du gène *SMN,* homologue à 99 % à la copie télomérique est appelée *SMN2* ou *SMNc* (Lefebvre et al, 1995). Les 2 gènes sont transcrits. L'analyse de leurs promoteurs a montré que ces éléments sont quasiment identiques tant au niveau de leur séquence qu'au niveau de leur activité (Echaniz-Laguna et al, 1999 ; Monani et al, 1999). Le gène *SMN2* est présent chez tous les patients, alors qu'il est absent chez 5 % des individus non atteints (Lefebvre et al, 1995), sans aucune conséquence clinique, ce qui indique qu'il n'est pas indispensable à la survie des motoneurones. C'est à partir de ces observations que le gène *SMN1* et non le gène *SMN2* a été reconnu comme le gène lié à la maladie (Lefebvre et al, 1995).

2.2/ Les gènes SMN1 et SMN2

Le gène *SMN1* se distingue du gène *SMN2* uniquement par 5 paires de bases (1 dans l'intron 6, 1 dans l'exon 7, 2 dans l'intron 7 et 1 dans l'exon 8) ***(Figure 2)***. Ces différences n'ont aucun effet sur la séquence en acides aminés de la protéine car elles sont silencieuses (Lefebvre et al, 1995 ; Burglen et al, 1996 et pour revues, Wirth, 2000 ; Wirth et al, 2006a). Les ARNm obtenus à partir des 2 gènes sont identiques à l'exception de 2 nucléotides situés dans les exons 7 et 8. Plus précisément, une transition en position +6 de l'exon 7 est responsable de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *SMN2*. Quand le nucléotide est une cytosine (C) comme dans le gène *SMN1*, l'exon 7 est reconnu et inclus dans la protéine. Si c'est une thymine (T), comme dans le gène *SMN2*, l'exon 7 est exclu de la majorité des ARNm ***(Figure 2)***. Les mécanismes gouvernant l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène *SMN2* restent encore peu clairs. Deux hypothèses ont été proposées pour l'expliquer ***(Figure 3)*** (pour revues, Wirth et al, 2006a ; Singh, 2007). Au moins trois éléments activateurs d'épissage (*exonic splicing enhancer* [ESE]) sont contenus dans l'exon 7. La transition pourrait soit interrompre un élément activateur de l'épissage de l'exon 7 liant le facteur d'activation de l'épissage ASF/SF2. Cet événement causerait alors le saut de l'exon 7 (Cartegni & Krainer, 2002 ; Cartegni et al, 2006). Soit la

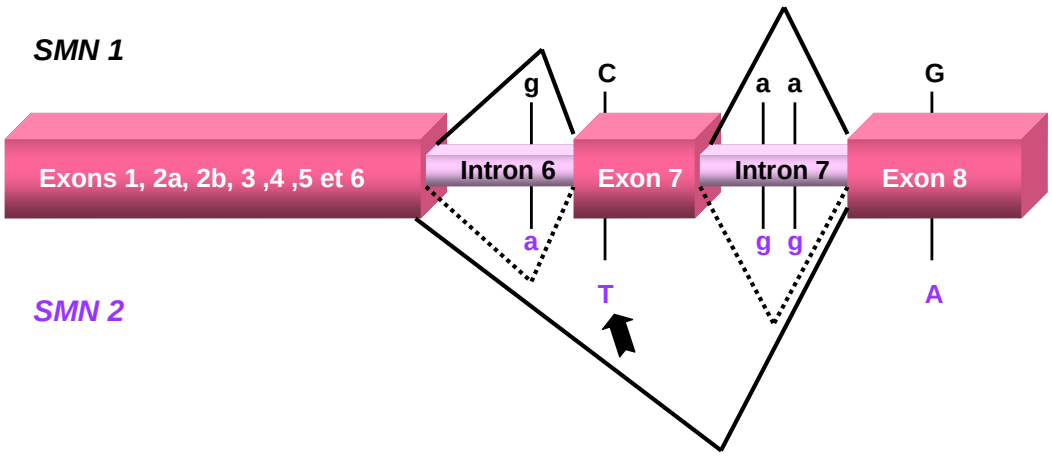


Figure 2 : Différences de séquence primaire et d'épissage entre les transcrits *SMN1* et *SMN2*

Le gène *SMN2* diffère en 5 positions par rapport au gène *SMN1*. La substitution d'une cytosine (C) en thymine (T) dans l'exon 7 du transcrit du gène *SMN2* (voir flèche) entraîne un épissage alternatif de l'exon 7. Les traits pleins représentent les séquences de l'ARN pré-messager majoritairement épissées. Les traits en pointillés représentent les séquences minoritairement épissées. Pour revue, Wirth et al, 2006a.

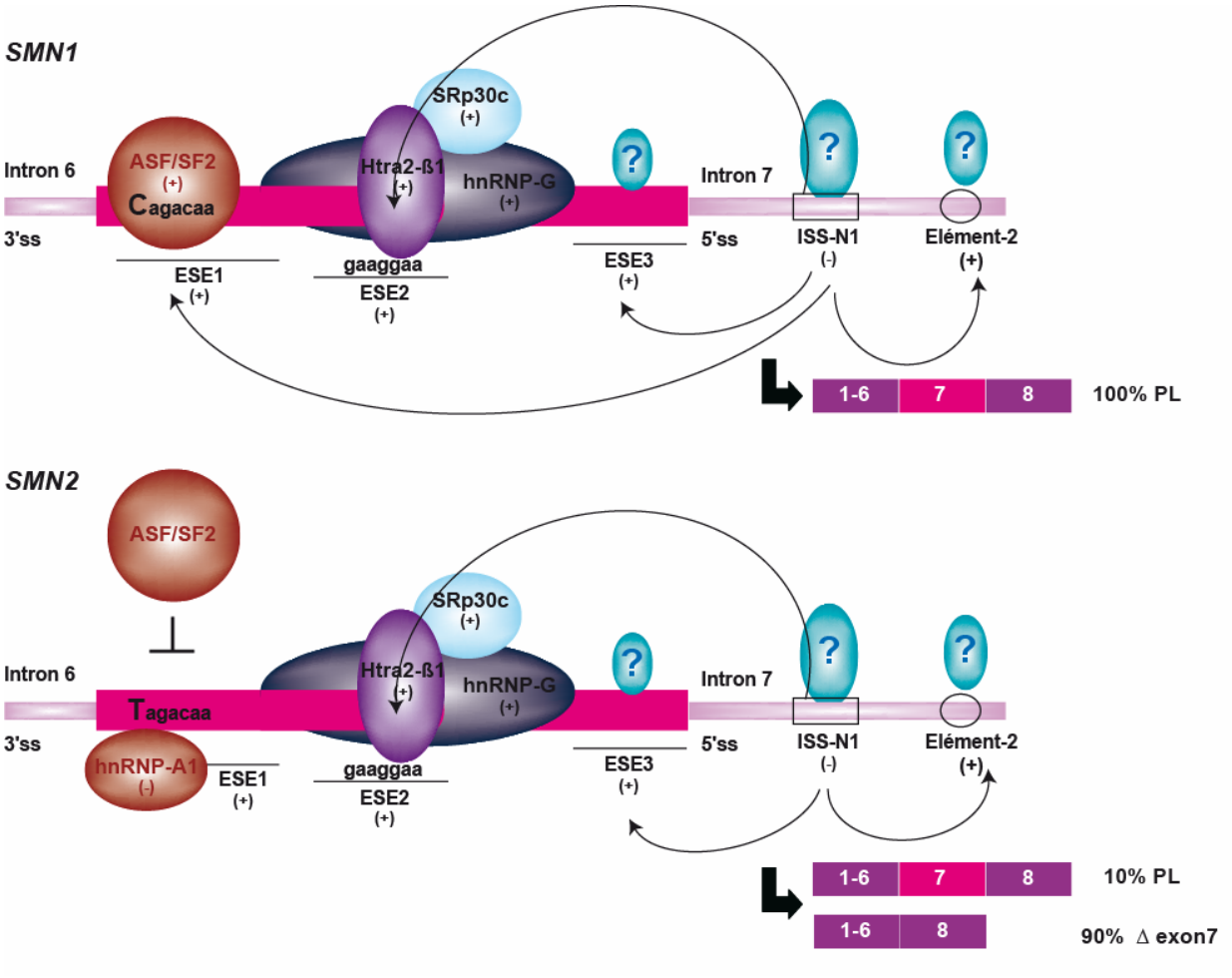


Figure 3 : Modèle de régulation de l'épissage de l'exon 7

L'exon 7 de *SMN1* contient une séquence heptamérique (ESE1) à son extrémité 5' reconnue par la protéine SR : ASF/SF2. Dans *SMN2*, la transition de C vers T empêcherait la fixation de ASF/SF2, ce qui entraînerait le saut de l'exon 7. De plus, la transition de C vers T favoriserait l'effet inhibiteur de hnRNP-A1 et faciliterait l'exclusion de l'exon 7. Les gènes *SMN1* et *SMN2* contiennent tous deux un ESE dans la partie centrale de l'exon 7 (ESE2) qui est reconnu par Htra2-β1 et ses partenaires d'interaction hnRNP-G et SRp30c. Ensemble, ils facilitent l'inclusion de l'exon 7 dans les gènes *SMN1* et *SMN2*. Les transcrits pleine longueur (PL) de SMN seraient produits seulement lorsque le domaine ESE2 est intact. De plus, l'exon 7 contient à son extrémité 3' un site ESE3, un autre élément activateur de l'épissage de l'exon. Dans l'intron 7, un site ISS (ISS-N1) pourrait exercer ses fonctions inhibitrices sur l'inclusion de l'exon 7. ESE : *exonic splicing enhancer*. ISS : *intonic splicing silencer*. Pour revue Wirth et al, 2006a.

transition dans l'exon 7 crée un élément inhibiteur de l'épissage (*exonic splicing silencer* [ESS]) permettant la fixation d'un répresseur de l'épissage, hnRNP-A1. La liaison du répresseur sur l'exon 7 du gène *SMN2* réprimerait alors son inclusion (Kashima & Manley, 2003 ; Kashima et al, 2007). Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et il est possible que les deux mécanismes co-existent ***(Figure 3)***. Les ARNm complets sont donc presque exclusivement produits par le gène *SMN1* alors que la forme prédominante codée par le gène *SMN2* (90 % environ) est dépourvue de l'exon 7 (Lefebvre et al, 1995 ; Gennarelli et al, 1995) ***(Figure 3)***. L'ARNm tronqué SMNΔexon7 code une protéine raccourcie de 16 résidus du côté carboxy-terminal, qui est instable *in vivo* (Vitte et al, 2007).

2.3/ La SMA : un défaut de protéine SMN

Il existe une étroite corrélation inverse entre la sévérité clinique de la maladie et la quantité de protéine intacte codée par le gène *SMN2* (Coovert et al, 1997 ; Lefebvre et al, 1997). En effet, en raison de la nature instable de la région contenant le locus SMA, les patients présentent, majoritairement, une délétion du gène *SMN1* et peuvent porter un nombre variable de copies du gène *SMN2* influençant la sévérité de la maladie (Wirth et al, 1997 ; Campbell et al, 1997 ; Parsons et al, 1998 ; Wirth et al, 1999 ; Feldkotter et al, 2002 ; Mailman et al, 2002) ***(Figure 4)***. Ainsi, la plupart des patients atteints de SMA de type I ont une ou deux copies du gène *SMN2*, la plupart des patient de type II en ont trois et la plupart des patient atteint de SMA de type III en possèdent trois ou quatre. Quelques patients peuvent avoir cinq ou 6 copies (Wirth et al, 2006b et pour revue, Prior et al, 2004). La présence d'une seule copie semble être très rare; elle est associée à un phénotype très sévère de SMA (Brahe, 2000) et la présence d'au moins 2 copies du gène *SMN2* est requise pour que les patients atteints de SMA de type I survivent quelques mois. L'effet bénéfique des gènes *SMN2* supplémentaires fait donc de ce gène une cible moléculaire privilégiée dans les stratégies thérapeutiques (cf. chapitre I, paragraphe I. 4/ *Stratégies thérapeutiques*). Toutefois, certains patients ayant le même nombre de copies présentent des degrés différents dans la sévérité de la maladie. D'autres facteurs que le nombre de copies du gène *SMN2* semblent donc jouer un rôle dans la variabilité phénotypique de la maladie (Parano et al, 1996). Par ailleurs, environ 5% des patients atteints de SMA ne présentent pas de délétion du gène

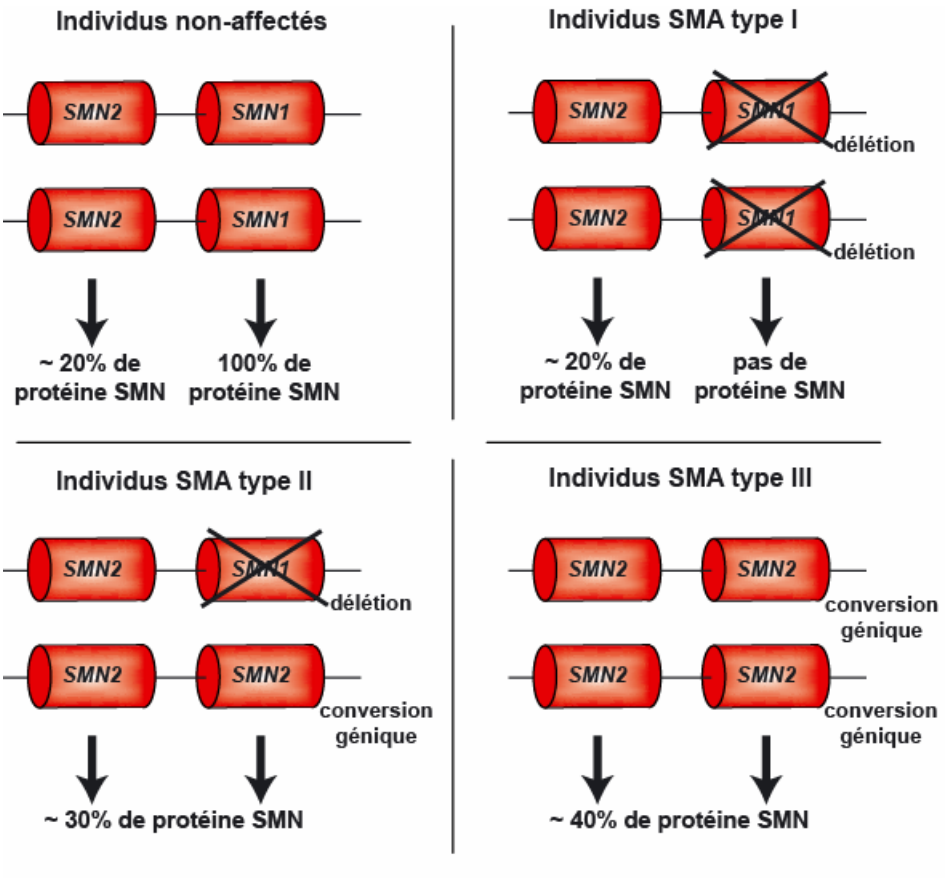


Figure 4 : Génotypes observés chez la plupart des patients atteints de SMA

Chez les individus atteints d'amyotrophie spinale (SMA), le gène *SMN1* est muté, délété ou converti en gène *SMN2*. Le facteur majeur influençant la sévérité de la maladie est le nombre de copies du gène *SMN2*. La plupart des patients SMA de type I ont une ou deux copies du gène *SMN2*, la plupart des patients de type II en ont trois et la plupart des patients SMA de type III en possèdent trois ou quatre voire plus. Comme chaque copies du gène *SMN2* produit environ 10% de protéine SMN entière et fonctionnelle, une augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* est bénéfique pour les patients atteints de SMA. Pour revue Wirth et al, 2006a.

SMN1 mais des mutations dans ce gène ***(Tableau I)***. A l'heure actuelle, 40 mutations ont déjà été identifiées, parmi lesquelles des mutations non-sens et faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des délétions, des inversions et des mutations dans un site d'épissage. La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7 (Y272C, T274I, G275S et G279C/V) et nous verrons que ces mutations perturbent les fonctions de la protéine SMN (Talbot et al, 1997 ; Hahnen et al, 1997 ; Lorson et al, 1998 ; Sun et al, 2005). La mutation E134K est une autre mutation fréquemment retrouvée ***(Tableau I)*** qui abolirait l'interaction de la protéine SMN avec certains de ces partenaires protéiques tels que les protéines Sm (cf. chapitre I, paragraphe II. 1.2.1/ *Le complexe SMN interagit à la fois avec les protéines Sm et les UsnRNA*) (Buhler et al, 1999).

3/ Modèles animaux d'amyotrophie spinale

Avec la connaissance accrue des gènes et les techniques de création de modèles animaux, de nombreux modèles ont été créés et apportent des informations considérables dans l'étude de la physiopathologie liée à la SMA et l'évaluation de nouvelles thérapeutiques et leurs mécanismes d'action ***(Tableau II)***.

3.1/ Les modèles murins (Mus musculus)

L'homme est le seul à posséder une copie *SMN2* du gène contrairement à la souris qui n'en possède qu'une seule située sur le chromosome 13 équivalente au gène *SMN1* (DiDonato et al, 1997 ; Viollet et al, 1997). Plusieurs modèles murins de SMA ont été générés ces dix dernières années. Ainsi, des souris déficientes au niveau du gène *Smn* (*Smn*$^{-/-}$) ont été obtenues par recombinaison homologue (Schrank et al, 1997). L'embryon se développe, d'abord normalement mais présente, ensuite, des altérations morphologiques et des dégénérescences qui conduisent à la mort, indiquant que le gène *SMN* est essentiel au développement embryonnaire et à la survie chez la souris. Pour contourner cette létalité embryonnaire, plusieurs stratégies ont permis de produire des modèles mimant le phénotype des patients atteints de SMA. Monani et al. (2000) ont obtenu un modèle présentant

Nomenclature standard de changement de nucléotides	Changement d'un seul acide aminé	Autre nomenclature utilisée dans la littérature	Site de mutation	Type de mutation	Type de SMA
5C>G (Parsons et al, 1998)	A2G	38C>G	Exon 1	Faux sens	II, III
22_23insA (ou 22dupA) (Tsai et al, 2001)				Décalage du cadre de lecture	I ou II
43C>T (Wirth et al, 1999)	Q15X	78C>T		Non sens	I, III
81_81+1insG (ou 81dupG) (Skordis et al, 2001)		Q27insG		Décalage du cadre de lecture	II
91_92insT (ou 91dupT) (Wirth et al, 1999)		124insT	Exon 2a	Décalage du cadre de lecture	I
208_209insGTGT (Wirth et al, 1999)		241-242in4	Exon 2b	Décalage du cadre de lecture	III
275G>C (Kotani et al, 2007)	W92S		Exon 3	Faux sens	I
305G>A (Sossi et al, 2001)	W102X			Non sens	II, III
(Cusco et al, 2004)	I116F			Faux sens	I
399_402delAGAG (Bussaglia et al, 1995 ; Cusco et al, 2003 ; Martin et al, 2002)		430del4		Décalage du cadre de lecture	I, II, III
400G>A (Sossi et al, 2001 ; Wirth, 2000)	E134K	433G>A		Faux sens	I
(Cusco et al, 2004)	Q136E			Faux sens	I
439_443delGAAGT (Brahe et al, 1996 ; Sossi et al, 2001)		425del5, 472del5		Décalage du cadre de lecture	I
509_510delGT (Parsons et al, 1998)		542delGT	Exon 4	Décalage du cadre de lecture	I, II, III
558delA (Wirth et al, 1999)		591delA		Décalage du cadre de lecture	II
585_586insT (ou 585dupT) (Wirth, 2000)		618insT		Décalage du cadre de lecture	I
683T>A (Tsai et al, 2001)	L228X		Exon 5	Non sens	I ou II
734C>T (Rochette et al, 1997)	P245L	767C>T	Exon 6	Faux sens	III
740_74insC (ou 472dupC) Martin et al, 2002)		773insC		Décalage du cadre de lecture	III
768_778dupTGCTGATGCTT (ou 770_780duoCTGATGCTTTG) (Parsons et al, 1996 ; Parsons et al, 1998 ; Martin et al, 2002 ; Wirth, 2000)		813ins/dup11, 800ins11		Décalage du cadre de lecture	I, II
785G>T (Hahnen et al, 1997 ; McAndrew et al, 1997)	S262I	818G>T		Faux sens	III
815A>G (Lefebvre et al, 1995 ; Rochette et al, 1997 ; Wirth et al, 1999 ; Wirth, 2000)	Y272C	848A>G		Faux sens	I, II, III
821C>T (Wirth et al, 1999 ; Wirth, 2000)	T274I	854C>T		Faux sens	II, III
823G>A (Skordis et al, 2001)	G275S			Faux sens	III
834+2T>G (ou IVS6+2T>G) (Martin et al, 2002)		c.867+2T>G	Intron 6	Site d'épissage	I
IVS6-18_IVS6-12edlCCTTTAT (Lefebvre et al, 1995 ; Wirth, 2000)		c.868-11del7		Site d'épissage	I
IVS6-2A>G (Eggermann et al, 2008)		c.868-2A>G		Site d'épissage	I
835G>T (Wang et al, 1997)	G279C	868G>T	Exon 7	Faux sens	II, III
836G>T (Talbot et al, 1997)	G279V	869G>T		Faux sens	I
IVS7+4_IVS7+7delAGTC (Lefebvre et al, 1995 ; Wirth, 2000)		c.922+3del4	Intron 7	Site d'épissage	II
IVS7+6T>G (Wirth et al, 1999)		c.922+6T>G		Site d'épissage	III
EX8del (Gambardella et al, 1998)			Exon 8	Délétion	II, III

Tableau I : Principales mutations du gène *SMN1* décrites chez les patients atteints d'amyotrophie spinale

Ins : insertion, Del : délétion Dup : duplication

Organismes	Type de manipulation	Caractéristiques phénotypiques de la maladie
S. *pombe* (Talbot et al, 1997 ; Paushkin et al, 2000)	Délétion	Cellules non viables.
	Surexpression des allèles sauvages	Augmentation du taux de croissance, viabilité non compromise.
	Surexpression des allèles délétés	Phénotype dominant négatif; croissance et viabilité compromises, les mutations non-sens causent la disparition de la protéine SMN du cytoplasme.
C. *elegans* (Talbot et al, 1997 ; Miguel-Aliaga et al, 1999)	Extinction des allèles sauvages par RNA interférence	Phénotype variable dans la progéniture allant de la létalité au stade embryonnaire à de multiples et sévères défauts dans le développement précoce.
	Surexpression	Viabilité embryonnaire de la progéniture compromise.
D. *melanogaster* (Chan et al, 2003 ; Rajendra et al, 2007)	Mutations non-sens produites spontanément (hypomorphiques)	Létalité larvaire tardive, mutant larvaire montrant une perte de mobilité et une désorganisation neuromusculaire sévère
D. *rerio* (McWhorter et al, 2003)	Extinction de *smn* par l'emploi de morpholinos anti-sens	Létalité embryonnaire entre la fin de la gastrulation et le début de la somitogenèse, défauts dans la croissance et le devenir des motoneurones.
M. *musculus* (Schrank et al, 1997 ; Monani et al, 2000b ; Monani et al, 2003 ; Frugier et al, 2000 ; Vitte et al, 2004 ; Cifuentes-Diaz et al, 2001 ; Cifuentes-Diaz et al, 2002 ; Nicole et al, 2003 ; Ferri et al, 2004 ; Le et al, 2005 ; Butchbach et al, 2007 et pour revue, Monani et al, 2000a)	Suppression homozygote de *smn*	$Smn^{-/-}$ *:* létalité embryonnaire avant implantation
	Complémentation chez les souris *Smn* knockout en variant le nombres de copies de transgènes *SMN2* humains et SMN mutant	1 à 2 copies de *SMN2* ; souris $Smn^{-/-}$: souris SMA de type I, mort dans les 1 à 8 jours
		souris $SMN2^{+/+}$; $\Delta 7^{+/+}$; $Smn^{-/-}$: souris SMA de type II, mort dans les 10 à 16 jours
		souris $SMN2^{+/-}$; $SMNA2G^{+/-}$; $Smn^{-/-}$: souris SMA de type III, survie possible de plus d'un an
		8 à 16 copies *SMN2*; $Smn^{-/-}$: complète délivrance phénotypique
	Délétion de *smn* dans les neurones en utilisant le système Cre-loxP	$Smn^{\Delta 7/F7}$; *NSE-Cre* : perte des axones moteurs mais pas du corps cellulaire, atrophie du muscle et mort dans les 4 semaines
	Délétion de *smn* dans le muscle en utilisant le système Cre-loxP	$Smn^{\Delta 7/F7}$; *HSA-Cre* : dystrophie musculaire, mort à 33 jours pour les mutants «sévères», pathologie similaire pour les mutants «moyens» mais augmentation de la survie avec mort dans les 8 mois.
	Délétion de *smn* dans le foie en utilisant le système Cre-loxP	$Smn^{\Delta 7/F7}$; *Alfp-Cre* : létalité embryonnaire tardive, atrophie, dysfonctionnement et perte de la capacité de régénération du foie

Tableau II : Organismes manipulés afin de reproduire la pathologie SMA de l'homme
Pour revues, Monani, 2005 et Schmid & DiDonato, 2007.

des symptômes identiques à ceux des malades atteints de SMA de type I, par introduction du gène *SMN2* humain entier dans des souris *Smn*$^{-/-}$ (Monani et al, 2000a). Le gène *SMN2* est donc capable de compenser le phénotype de létalité embryonnaire de ces souris. De plus, chez la souris, comme chez l'homme une augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* diminue la sévérité de la maladie ***(Tableau II, page 15)***. Ainsi, l'introduction de 8 copies du gène *SMN2* empêche le développement de la maladie (Monani et al, 2000a). Les souris qui présentent une forme sévère de SMA (souris avec 1 ou 2 copie(s) du gène *SMN2*) ont le même nombre de motoneurones un jour après la naissance que les souris sauvages. Par contre, 5 jour après la naissance, elles perdent environ 40% des motoneurones de la moelle épinière (Monani et al, 2000a). Les mêmes observations ont été faites chez les patients atteints de SMA (Bromberg & Swoboda, 2002) et chez le poisson zèbre déficient pour le gène *SMN* (McWhorter et al, 2003). Cette observation indique que la perte des motoneurones serait un évènement tardif dans la progression de la maladie. Récemment, il a été observé un défaut d'excitabilité des motoneurones des souris SMA due à une intégration réduite des canaux dépendant du calcium dans les cônes de croissance, pouvant conduire à un défaut de fonctionnement des synapses (Jablonka et al, 2007).

Un autre modèle murin de SMA a été obtenu par délétion conditionnelle de l'exon 7 du gène *Smn* murin en utilisant le système de recombinaison Cre-loxP du bactériophage P1 (Frugier et al, 2000). Le gène de la recombinase *Cre*, exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique du cerveau, permet d'induire la délétion de l'exon 7 du gène *SMN* spécifiquement dans les neurones. Bien que ces souris soient normales à la naissance, elles développent des déficits moteurs, des tremblements et une paralysie après quelques semaines et meurent 3 à 5 semaines après leur naissance. Ces souris présentent une désorganisation des jonctions neuromusculaires et un taux d'axones moteurs réduit. La dégénérescence des motoneurones apparaît dès le 20ème jour après la naissance (Ferri et al, 2004).

Le même système Cre/lox a aussi été utilisé pour cibler, spécifiquement, le muscle (Cifuentes-Diaz et al, 2001). Ainsi, les souris mutantes présentent une délétion de l'exon 7 du gène *SMN* au niveau du muscle squelettique. Elles présentent une paralysie musculaire qui commence après 3 semaines de vie, une nécrose des muscles et évoluent

rapidement vers la mort. Dans un autre modèle, la délétion de l'exon 7 du gène *SMN* est réalisée soit dans les cellules satellites (qui sont des cellules souches embryonnaires) et les myotubes, soit uniquement dans les myotubes qui se différencieront, ensuite, en cellules musculaires. Quand l'expression du gène *SMNΔExon7* a lieu à la fois dans les myotubes et dans les cellules satellites, les souris développent une myopathie sévère et présentent une diminution de la régénération musculaire. Par contre, quand les cellules satellites restent intactes et bien que les souris développent aussi une myopathie, le phénotype est moins grave. Ces résultats montrent que les cellules satellites intactes augmentent la survie et les performances motrices des souris mutantes (Nicole et al, 2003). Ces observations, ainsi que les travaux réalisés chez la drosophile, suggèrent que les muscles puissent jouer un rôle dans la pathologie SMA.

3.2/ La drosophile (Drosophila melanogaster)

Deux modèles de drosophile présentant des mutations ponctuelles différentes existent (Smn^{73Ao} et Smn^{B} ou G202S et S201F respectivement) (Chan et al, 2003). Ces mutations correspondent à des mutations identifiées dans le gène *SMN1* de nombreux patients atteints de SMA (Y272C, T274I et G275S) ***(Tableau I, page 14)*** et responsables d'un défaut de dimérisation de la protéine SMN (Lorson et al, 1998). Les embryons survivent jusqu'au stade larvaire mais présentent des défauts de mobilité (Chan et al, 2003). Un troisième modèle de drosophile a été généré à partir de mutations hypomorphiques du gène *Smn* qui réduisent le taux de protéines dSMN et entraînent des défauts dans le vol et une désorganisation neuromusculaire sévère (Rajendra et al, 2007). Chez la drosophile, l'activité du gène *Smn* serait donc requise à la fois dans les neurones et les muscles squelettiques.

3.3/ Le poisson zèbre (Danario rerio)

Le poisson zèbre, qui peut être facilement manipulé génétiquement, possède une fécondation externe, un développement rapide de l'embryon et reste transparent durant les premiers jours de sa vie (pour revue, Grunwald & Eisen, 2002). De ce fait, il est beaucoup utilisé comme modèle pour l'étude des processus liés au développement. De plus, les

connaissances acquises sur son système neuromusculaire en font un modèle exceptionnel d'observation, *in vivo,* du développement des motoneurones et des prolongements axonaux (pour revues, Schmid & DiDonato, 2007 ; Beattie et al, 2007). Ce modèle a donc été utilisé afin d'élucider le rôle de la protéine SMN dans le développement embryonnaire des motoneurones principalement par la technique d'ARN interférent basée sur l'emploi des morpholinos (McWhorter et al, 2003 et pour revue, Beattie et al, 2007). Cette méthode permet de diminuer le taux de protéine SMN au début du développement comme c'est le cas pour les patients atteints de SMA (McWhorter et al, 2003). Cette diminution cause d'important défauts dans la croissance et le devenir des motoneurones. En effet, les axones moteurs sont plus petits et présentent un nombre excessif d'embranchements. Par contre, la diminution du taux de protéine SMN ne semble n'avoir aucun effet sur les muscles, contrairement à ce qui a été observé chez la drosophile. Bien qu'ils soient anormaux, les axones moteurs du poisson zèbre, où le taux de protéine SMN est réduit, sont capables, uniquement dans les premiers stades du développement, d'établir des connexions avec les muscles, comme c'est le cas pour les patients atteints de SMA (Jablonka et al, 2004 ; Rossoll et al, 2003 ; Carrel et al, 2006).

3.4/ Les autres modèles

La levure *Schizosaccharomyces pombe*, a été le premier modèle unicellulaire utilisé pour étudier la génétique chez les eucaryotes (pour revue, Hedges, 2002). La levure *S. pombe* possède un gène *SMN* : *ySMN* (Talbot et al, 1997 ; Owen et al, 2000) essentiel à sa viabilité (Paushkin et al, 2000). La surexpression de *ySMN* est délétère pour *S. pombe*, mais pas létale et conduit à des retards de croissance contrairement à la surexpression de *hSMN* chez *S. pombe* qui est létale (Paushkin et al, 2000).

Caenorhabitis elegans est un modèle d'étude qui combine les avantages des organismes complexes (pluricellulaires) à des caractéristiques physiologiques qui en font un organisme particulièrement bien adapté à la neurobiologie. En effet, *C. elegans* possède un système nerveux simple avec moins de 100 motoneurones chez l'adulte (Sulston, 1983). Il possède également un gène *SMN* : *CeSMN* essentiel à la viabilité embryonnaire (Talbot et al, 1997). L'extinction de *CeSMN,* par la technique d'ARN interférence, conduit à de nombreux défauts neuronaux, des mouvements non coordonnés et à la stérilité (Miguel-Aliaga et al,

1999). Sa surexpression conduit à la stérilité et à la létalité embryonnaire (Miguel-Aliaga et al, 1999 et pour revue, Culetto & Sattelle, 2000).

4/ Stratégies thérapeutiques

Actuellement, en dépit des avancées thérapeutiques, les personnes atteintes d'amyotrophie spinale ne bénéficient d'aucun traitement curatif permettant une guérison. Bien que le mécanisme moléculaire responsable de la pathologie SMA n'ait pas encore été précisément défini, les connaissances accumulées ces dernières années ont permis l'émergence de différentes approches thérapeutiques. Plusieurs stratégies, en cours d'étude, consistent à augmenter le taux de protéine SMN pleine longueur. Elles visent l'activation de l'expression du gène *SMN2*, l'augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit *SMN2* ou la stabilisation de la protéine SMN. D'autres stratégies impliquent l'identification de molécules ayant un rôle protecteur des motoneurones présentant des taux faibles de protéine SMN, le remplacement du gène *SMN1* par thérapie génique et l'introduction de motoneurones ou des cellules musculaires par l'emploi de cellules souches embryonnaires ***(Figure 5)*** (pour revues, Wirth et al, 2006a ; Sumner, 2006 et Sumner, 2007).

4.1/ Activation du gène SMN2 : les inhibiteurs d'histones déacétylases et les autres composés chimiques

Plusieurs études ont montré que des composés capables d'inhiber les histones déacétylases (HDAC), des enzymes impliquées dans la modulation de l'expression des gènes (pour revue, Minucci & Pelicci, 2006) pouvaient augmenter la synthèse de la protéine SMN. Certains de ces inhibiteurs sont capables d'activer le promoteur du gène *SMN2* et donc de moduler son expression, très certainement par modification du taux d'acétylation des histones du promoteur (Kernochan et al, 2005). C'est le cas de l'acide valproïque (Brichta et al, 2003 ; Sumner et al, 2003 ; Tsai et al, 2006 ; van Bergeijk et al, 2006 ; Weihl et al, 2006), du butyrate de sodium (Chang et al, 2001), du phénylbutyrate (Andreassi

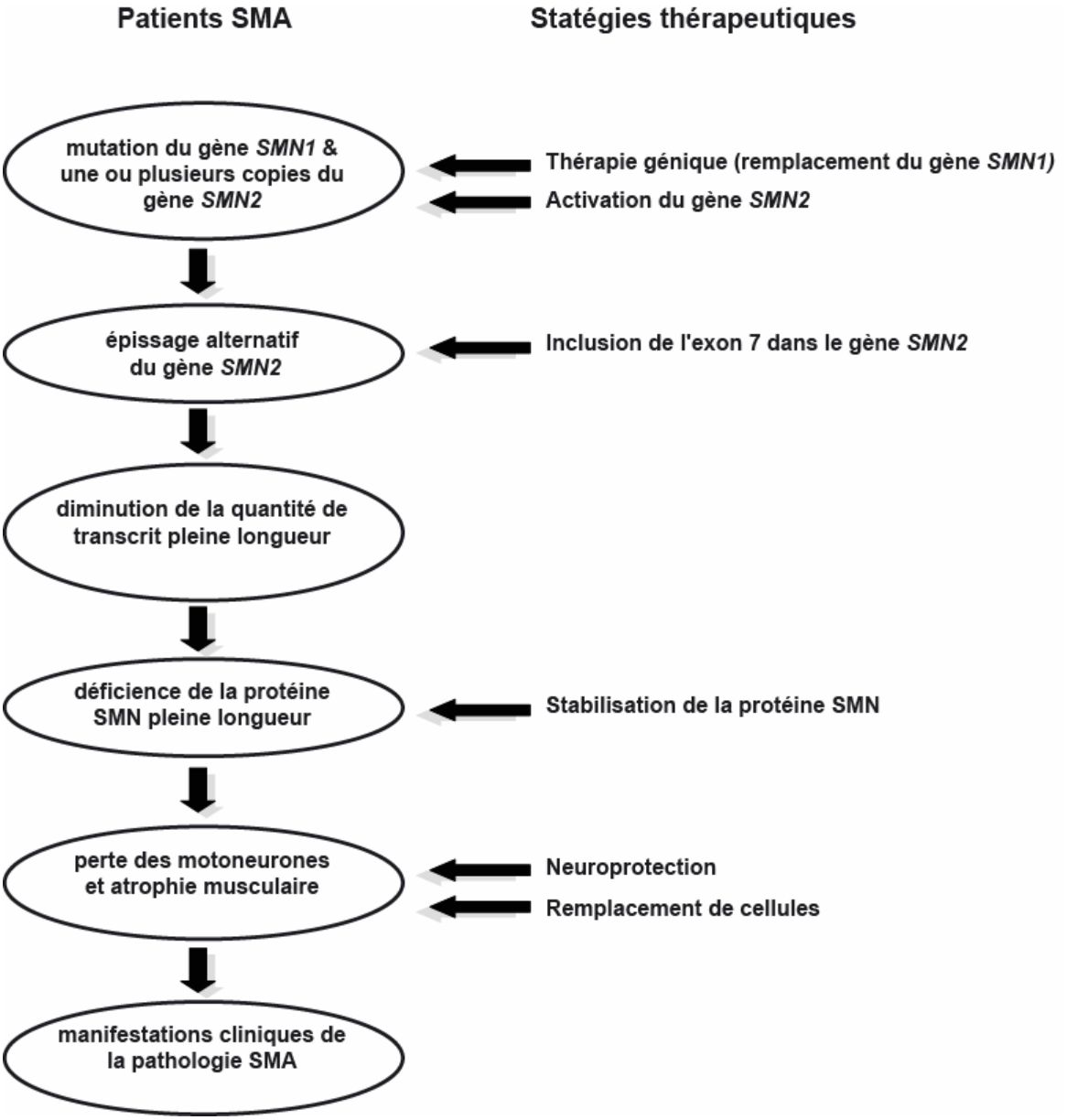


Figure 5 : Cibles potentielles pour la thérapie de la pathologie SMA

Différentes approches thérapeutiques ont été envisagées ces dernières années. Plusieurs stratégies, en cours d'étude, consistent à augmenter le taux de protéine SMN pleine longueur. D'autres stratégies impliquent l'identification de molécules ayant un rôle protecteur des motoneurones présentant des taux faibles de protéines SMN, le remplacement du gène *SMN1* par thérapie génique et le remplacement des motoneurones ou des cellules musculaires. Pour revues, Sumner, 2006 et Sumner, 2007.

et al, 2004 ; Mercuri et al, 2004 ; Brahe et al, 2005), du benzamide M344 (Riessland et al, 2006), de la trichostatine (Avila et al, 2007) et du SAHA *(suberoylanilide hydroxamic acid*) (Hahnen et al, 2006). Ces composés sont, en effet, capables d'augmenter le taux d'ARNm et de protéine SMN, dans des lignées dérivant de cellules de patients atteints de SMA, en activant le promoteur du gène et dans certains cas en favorisant l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit du gène *SMN2*. L'acide valproïque atténuerait la mort des motoneurones et augmenterait les fonctions motrices des souris SMA (Tsai et al, 2006). Dans des lignées cellulaires en culture, ce composé pourrait également avoir un effet positif sur la croissance des neurites indépendamment de son effet sur le gène *SMN2* (van Bergeijk et al, 2006). La trichostatine A est un inhibiteur des HDAC plus puissant et plus spécifique que les autres composés utilisés jusqu'alors. Elle permettrait une augmentation de la survie des souris, une diminution de la perte de poids, de meilleurs réflexes de redressement et une meilleure capacité à se mouvoir (Avila et al, 2007). L'acide valproïque (USA) (Weihl et al, 2006) et le phénylbutyrate (Italie) (Mercuri et al, 2007) sont actuellement en phase d'étude clinique chez l'homme. Une augmentation de la force musculaire a été décrite chez des patients atteints de SMA de types III et IV traités avec l'acide valproïque (Weihl et al, 2006). Le phénylbutyrate semble bien toléré par les patients mais ne montre pas d'efficacité (Mercuri et al, 2007).

D'autres molécules, différentes des HDAC, auraient la capacité d'activer l'expression du gène *SMN2*. L'hydroxyurée augmente le taux d'expression du transcrit *SMN2*, de la protéine SMN et des Gems dans des cultures de cellules provenant de patients atteints de SMA. Cette augmentation varie en fonction de la concentration d'hydroxyurée et du temps de traitement des cellules. D'autre part, l'hydroxyurée est connue pour sa bonne tolérance chez les enfants et sa facilité d'administration par voie orale (Grzeschik et al, 2005). A l'heure actuelle, des essais thérapeutiques de phases II/III de l'hydroxyurée, randomisés, en double aveugle, contre placebo sont en cours au Japon (Liang et al, 2008) et aux USA. Cependant, les premiers résultats n'ont pas mis en évidence d'effets cliniques bénéfiques de ce médicament, des essais cliniques à plus grande échelle avec l'hydroxyurée sont envisagés (Liang et al, 2008). Deux composés : quinazoline et indole augmenteraient également le taux de protéine SMN et le nombre de Gems dans des cellules provenant de patients atteints de SMA. De plus, il semble que les effets de ces deux molécules s'additionnent lorsqu'elles sont utilisées

conjointement (Jarecki et al, 2005). Des études sur des composés dérivés de la quinazoline, qui pourraient être plus efficaces, sont actuellement en cours (Thurmond et al, 2008).

4.2/ Inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu du gène SMN2

Une augmentation du taux de protéines entières peut également être obtenue par l'utilisation de molécules induisant l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*. L'aclarubicine favoriserait l'inclusion de l'exon 7 dans des fibroblastes de patients atteints de SMA ou du modèle de souris SMA (Andreassi et al, 2001 ; Ting et al, 2007). Cependant la toxicité élevée de cette molécule ne permet pas de l'envisager comme traitement. Récemment, le salbutamol (albuterol) a permis une augmentation rapide et significative des transcrits *SMN2* pleines longueurs dans des fibroblastes de patients atteints de SMA, en favorisant l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* (Angelozzi et al, 2008). Au cours d'un essai pilote, le salbutamol avait déjà montré des effets bénéfiques chez des patients atteints de SMA sans causer trop d'effets indésirables (Kinali et al, 2002) ; cette molécule pourrait donc être adaptée à un traitement clinique. D'autres composés présentent des effets similaires : le 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) (Yuo et al, 2008) et certains polyphénols (Sakla & Lorson, 2008).

De nombreuses stratégies non pharmacologiques, utilisant des oligonucléotides et des oligoribonucléotides antisens, ont également été mises au point pour favoriser l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* ***(Figure 6)*** :

- L'utilisation d'oligonucléotides antisens réduisant la reconnaissance du site 3' d'épissage de l'exon 8 augmente l'incorporation de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* ***(Figure 6 A/)*** (Lim & Hertel, 2001).
- L'utilisation d'oligonucléotides antisens contenant des groupement 2'-O-methyl phosphorotioate ou des petits ARN U7 modifiés portant des séquences anti-sens spécifiques à l'ARNm *SMN2,* dans des réactions d'épissage *in vitro* ou introduits dans des cellules en culture, bloque l'accès à la jonction intron7-exon8 et conduisent à une

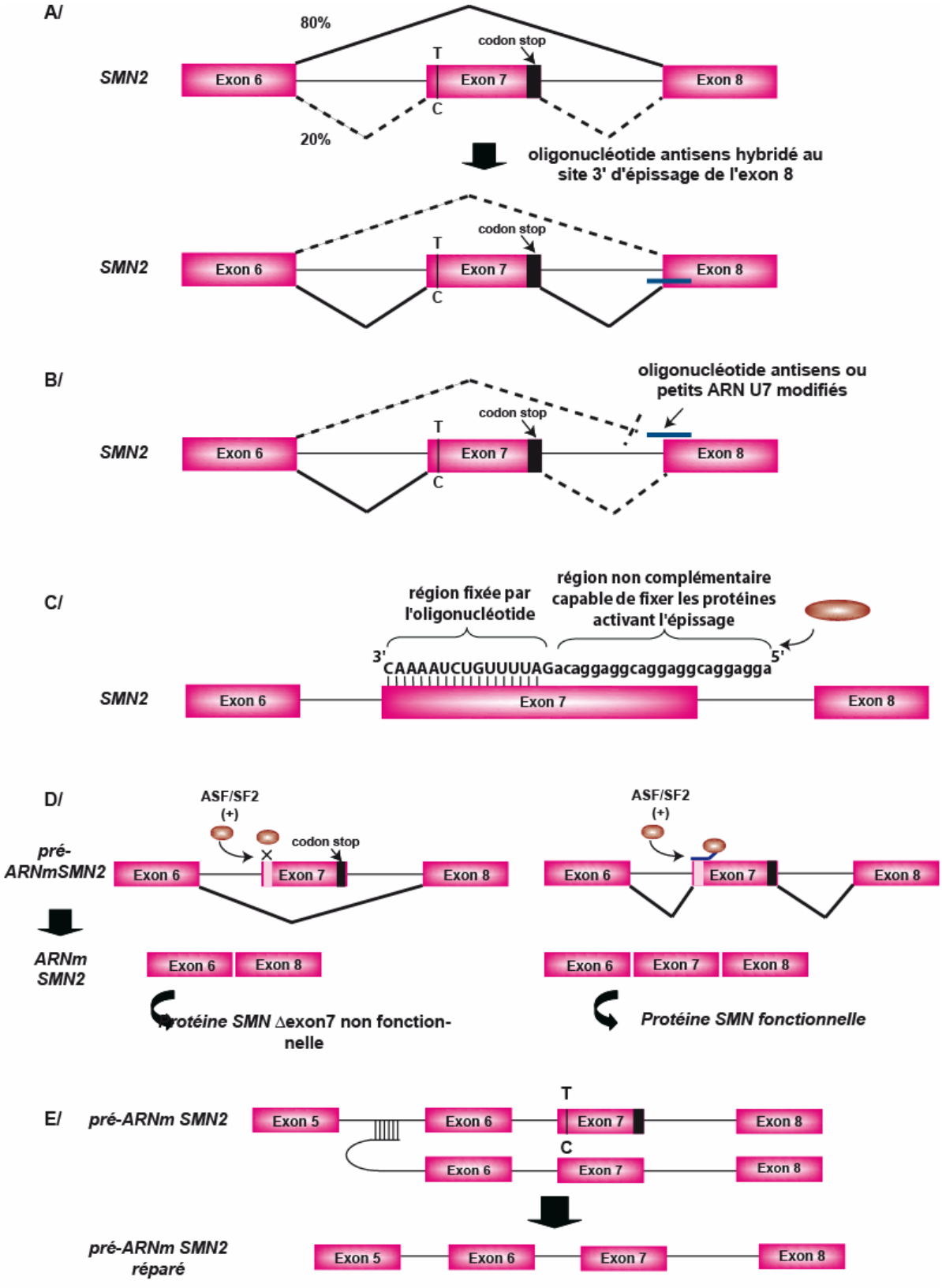


Figure 6 : Inclusion de l'exon 7 par stratégies non pharmacologiques

Plusieurs stratégies non pharmacologiques ont été développées ces dernières années pour essayer de favoriser l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*. D'après Lim & Hertel, 2001 ; Madocsai et al, 2005 ; Skordis et al, 2003 ; Cartegni & Krainer, 2003 et la revue, Wood et al, 2007.

augmentation de l'inclusion de l'exon 7 ***(Figure 6 B/)*** (Madocsai et al, 2005).

- L'inclusion de l'exon 7 peut également être augmentée par l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre des éléments silencieux d'épissage (ISS) (Miyajima et al, 2002 ; Singh et al, 2006 ; Hua et al, 2008).
- Des oligonucléotides antisens hybrides sont également à l'étude. Ces oligonucléotides, complémentaires à l'exon 7, contiennent des éléments reconnus par des facteurs activateurs de l'épissage de l'exon (ESE) ***(Figure 6 C/)***. Ces oligonucléotides restaurent l'incorporation de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* dans des fibroblastes dérivés de patients atteints de SMA (Skordis et al, 2003). Des vecteurs viraux sont actuellement en cours de développement afin de délivrer ces oligonucléotides chez des patients atteints de SMA (Baughan et al, 2006).
- Des oligonucléotides, complémentaires à l'exon 7, ont également été couplés à des effecteurs synthétiques mimant les fonctions des protéines SR, activatrices d'épissage ***(Figure 6 D/)***. Ces molécules, nommées ESSENCE *(Exon-Specific Splicing Enhancement by Chimeric Effectors)*, sont capables de stimuler l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* au cours de réactions d'épissage *in vitro* et dans des fibroblastes dérivés de patients SMA (Cartegni & Krainer, 2003 ; Hua et al, 2007).
- Récemment, une nouvelle approche thérapeutique a été développée et repose sur l'épissage en *trans* (pour revue, Wood et al, 2007). L'épissage en *trans* est un processus naturel mais rare chez les mammifères, qui implique un épissage entre deux transcrits produits séparément. L'utilisation de ce procédé offre la possibilité de corriger une mutation dans l'ARN pré-messager et de produire un ARNm sauvage. En effet, un ARN en *trans* contenant une région antisens à l'ARN pré-messager, des sites d'épissage et les exons nécessaires à la réparation de l'ARN pré-messager permet par remplacement des exons, l'élimination de la région mutée de l'ARN pré-messager défectueux et la production d'un ARNm sauvage. Cette nouvelle technique est maintenant développée dans le cadre de la pathologie SMA. Elle permet l'épissage en *trans* du transcrit *SMN2* dans des fibroblastes issus de patients grâce à des ARN produits à partir de vecteurs viraux dérivés des adénovirus ***(Figure 6 E/)*** (Coady et al, 2007).

4.3/ Stabilisation de la protéine SMN et augmentation de sa traduction à partir du gène SMN2

L'indoprofen est un composé qui permet l'augmentation de la production de la protéine SMN à partir du gène *SMN2* mais pas à partir du gène *SMN1*. Ce composé n'agirait pas au stade transcriptionnel mais augmenterait plutôt l'efficacité de la traduction des transcrits *SMN2* (Lunn et al, 2004). Les aminoglycosides auraient également la capacité d'augmenter le taux de protéine SMN et de Gems dans des fibroblastes dérivés de patients atteints de SMA (Wolstencroft et al, 2005 ; Mattis et al, 2006). Ces composés, habituellement utilisés comme antibiotiques, seraient capables d'induire le franchissement des codons stop par les ribosomes et donc de permettre la synthèse d'une protéine entière. Ici, les aminoglycosides permettraient de franchir le codon stop de l'exon 8 et d'ajouter quelques acides aminés à la protéine tronquée qui se substitueraient alors à la partie correspondant à l'exon 7 manquant et conduiraient à la stabilisation de la forme partiellement active de la protéine tronquée (Wolstencroft et al, 2005). Malheureusement, l'indoprofen comme les aminoglycosides ont une faible capacité de pénétration dans le système nerveux central, les rendant pour l'instant inutilisables pour traiter des patients atteints de SMA.

4.4/ Neuroprotection

Pour protéger les motoneurones, des substances pharmacologiques ont été sélectionnées pour leur effet connu dans des maladies neuro-dégénératives ou à partir de criblages de molécules augmentant la survie des motoneurones en culture ou stabilisant la pathologie sur un modèle animal. Actuellement deux substances neurotrophiques sont à l'essai, chez l'homme : le riluzole et le TRO19622. Une expérimentation menée sur des souris SMA a révélé un faible bénéfice du riluzole sur la survie des souris et sur une protection de la jonction neuromusculaire (Haddad et al, 2003). De plus, il semble bien toléré chez des patients atteints de SMA de type I (Russman et al, 2003). A l'heure actuelle, le riluzole est en essai clinique de phase II/III afin d'évaluer son efficacité et sa tolérance sur la fonction motrice chez des enfants et de jeunes adultes atteints de SMA de type II ou III. Une autre étude avec la cardiotrophine-1, une drogue neuroprotectrice, a montré une amélioration de la

survie des souris SMA et un retard dans l'apparition des défauts moteurs (Lesbordes et al, 2003).

4.5/ Thérapie génique et remplacement cellulaire

Une étude récente chez la souris apporte des résultats prometteurs en ouvrant la voie à la possibilité d'une thérapie génique pour les patients souffrant d'amyotrophie spinale. En effet, après l'injection de vecteurs lentiviraux (virus EIAV) portant le gène *SMN1* dans le muscle d'une souris SMA, le gène a été transporté et exprimé dans les motoneurones de la moelle épinière. Cette injection a permis d'obtenir une expression durable du transgène et de prolonger la survie de l'animal (Azzouz et al, 2004). Une autre stratégie qui fait l'objet de recherche concerne le « remplacement » de motoneurones grâce à la thérapie cellulaire (pour revue, Nayak et al, 2006). En l'occurrence, des cellules souches embryonnaires, différenciées en motoneurones ont été transplantées dans la moelle épinière de rats présentant une dégénérescence des motoneurones. Ces cellules ont survécu et ont produit des axones (Harper et al, 2004).

II/ Le complexe SMN et sa localisation cellulaire

1/ Présentation de la protéine SMN

La protéine SMN (*Survival of Motor Neurons ou Survie des MotoNeurones*) est une protéine ubiquitaire nécessaire à la survie cellulaire, comme mentionné ci-dessus. Elle est présente chez tous les eucaryotes supérieurs, elle a également été caractérisée chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, mais elle est absente chez *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue, Paushkin et al, 2002). La protéine SMN est une protéine de 294 acides aminés qui présente une masse moléculaire de 36 kD. Sa séquence n'est homologue à aucune des protéines répertoriées dans les banques de données actuelles, mais la protéine SMN possède plusieurs séquences conservées ***(Figure 7)***.

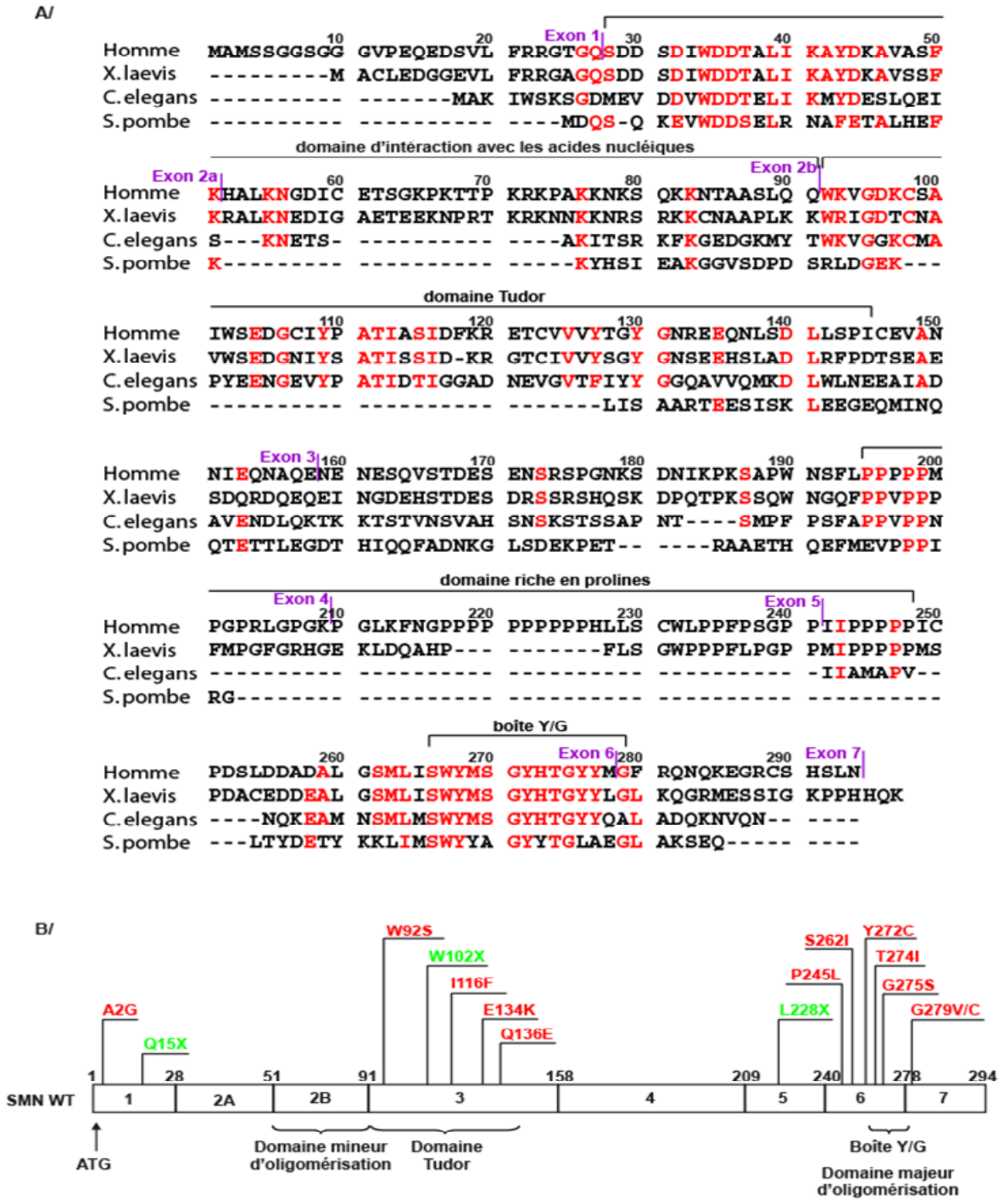


Figure 7 : Séquence et domaines fonctionnels de la protéine SMN

A/ Alignement des séquences des protéines SMN de divers organismes. Les régions codées par les différents exons sont indiquées et les tirets représentent l'absence de l'acide aminé. Les acides aminés en rouge sont conservés. D'après la revue, (Paushkin et al, 2002). **B/** Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine SMN avec la nature et les positions des mutations ponctuelles, trouvées dans le gène *SMN1* des patients atteints de SMA. En vert, sont indiquées les mutations non-sens et en rouge les mutations faux-sens. D'après Wirth, 2000 ; Ogino & Wilson, 2002 ; Ogino & Wilson, 2004.

1.1/ Les domaines fonctionnels de la protéine SMN

La protéine SMN est composée de plusieurs domaines distincts : une région de liaison aux acides nucléiques (Lorson & Androphy, 1998), un domaine Tudor (Talbot et al, 1998 ; Selenko et al, 2001 et pour revue Ponting, 1997), une région riche en prolines (Lefebvre et al, 1995 ; DiDonato et al, 1997) et des domaines d'oligomérisation (Lorson et al, 1998 ; Young et al, 2000) ***(Figure 7)***. La région codée par l'exon 2b, le domaine Tudor et la boîte Y/G sont les régions les plus conservées de la protéine SMN (pour revue, Paushkin et al, 2002).

Le domaine de liaison aux acides nucléiques de la protéine SMN est codée par l'exon 2b (Lorson & Androphy, 1998). Il est nécessaire et suffisant pour permettre une liaison non-spécifique de la protéine SMN à l'ARN ou à l'ADN. Par ailleurs, la protéine SMN interagit préférentiellement avec des séquences poly(G), par rapport aux séquences poly(A), poly(C) et poly(U) (Bertrandy et al, 1999).

Dans sa région centrale se trouve un domaine Tudor, phylogénétiquement très conservé et rencontré dans de nombreuses protéines eucaryotes, en particulier dans les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Cette séquence a été initialement décrite pour la protéine Tudor de la drosophile (pour revues, Ponting, 1997 ; Maurer-Stroh et al, 2003). Le domaine Tudor est codé par l'exon 3 de la protéine SMN (acides aminés 91 à 158) et serait important pour l'interaction de la protéine SMN avec des protéines contenant des motifs riches en arginines-glycines (RG) (Buhler et al, 1999 ; Sprangers et al, 2003 ; Cote & Richard, 2005). Plusieurs mutations ponctuelles, dont la mutation E134K fréquemment trouvée chez les patients atteints de SMA, se situent à l'intérieur de ce domaine ***(Tableau I et figure 7 B/).***

La protéine SMN possède un domaine riche en prolines bien conservé entre l'homme et la souris et à moindre degré chez *Xenopus Laevis* (Lefebvre et al, 1995 ; DiDonato et al, 1997). Par contre, ce domaine est absent de la protéine SMN de *C. elegans* et *S. pombe* ***(Figure 7)***.

La protéine SMN a la capacité d'oligomériser grâce à une interaction entre ses domaines N et C terminaux ***(Figure 8)*** (Lorson et al, 1998 ;Young et al, 2000). Un triple motif peptidique riche en glycines et tyrosines (Y-X-X-G) dans l'exon 6 (acides aminés 266 à 279) appelé boîte Y/G, constitue le domaine majeur d'oligomérisation de la protéine.

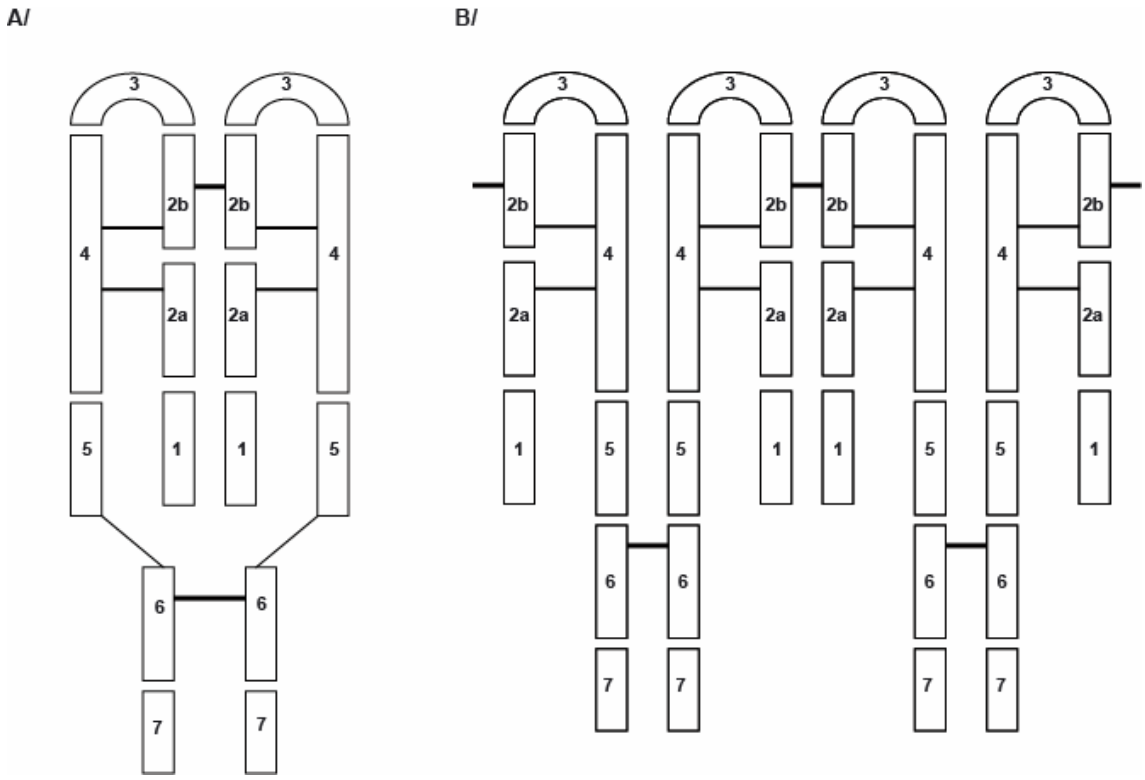


Figure 8 : Modèle schématique de l'architecture de la protéine SMN sous forme dimérisée (A) et oligomérisée (B)

A/ Chacun des sites d'auto-association codés par les exons 2b et 6 est impliqué dans la dimérisation de la protéine SMN. La région protéique d'oligomérisation intramoléculaire codée par l'exon 4 servirait de plateforme en s'associant aux exons 2a et 2b. **B/** Dans le modèle d'oligomérisation proposé, l'exon 6 code un site d'auto-association assurant une dimérisation initiale et l'exon 2b code un site qui, par la suite, permettrait l'oligomérisation. Les interactions entre les fragment SMN sont schématisées par des barres noires épaisses. D'après Young et al, 2000.

La séquence de la boîte Y/G a été hautement conservée durant l'évolution. Un grand nombre de mutations ponctuelles, dont la mutation faux-sens Y272C, fréquemment trouvée chez les patients atteints de SMA, se situent à l'intérieur ou à proximité de cette boîte ***(Tableau I et figure 7B/)*** (Talbot et al, 1997 ; Lorson et al, 1998). De plus, l'oligomérisation médiée par ce domaine est essentielle au maintien de nombreuses activités du complexe SMN que nous détaillerons dans un prochain chapitre. Le second domaine d'oligomérisation à l'extrémité N-terminale est codé par l'exon 2b dont la séquence correspond à un motif de 9 acides aminés : PAKKNKSQK (Young et al, 2000 ; Ogawa et al, 2007 ; Morse et al, 2007) ***(Figure 8)***.

1.2/ Localisation et expression de la protéine SMN

La protéine SMN a une localisation diffuse dans le cytoplasme. Elle est également présente dans le noyau, où elle est concentrée dans des corps nucléaires appelés «*Gems*» (pour *gemini of coiled bodies*) ***(Figure 9)***. Les *Gems* ont été identifiés pour la première fois dans des cellules HeLa (souche PV) et sont des structures nucléaires qui contiennent des concentrations élevées et localisées de protéine SMN (Liu & Dreyfuss, 1996). Les *Gems* sont souvent associés aux Corps de Cajal (*Cajal Bodies ou CB*), des structures similaires en taille et en nombre, et qui sont impliquées dans l'assemblage et la maturation de particules ribonucléoprotéiques (RNP). Plus précisément, les Gems coïncident avec les Cajal Bodies dans la plupart des lignées cellulaires et des tissus adultes mais sont séparés des Cajal Bodies dans les tissus fœtaux (Carvalho et al, 1999 ; Young et al, 2001).

Le domaine Tudor de la protéine SMN jouerait un rôle dans sa localisation nucléaire. Il serait également, essentiel, mais pas suffisant pour sa localisation dans les CB ; c'est la boîte Y/G et une région codée par l'exon 2b qui la stabiliseraient (Renvoise et al, 2006 ; Morse et al, 2007). Une explication serait que l'oligomérisation de la protéine SMN pourrait favoriser l'accumulation de la protéine SMN dans les CB en permettant son interaction avec des composant des CB, comme les UsnRNP (Renvoise et al, 2006 ; Morse et al, 2007). Nous verrons dans le chapitre suivant que l'import de la protéine SMN dans le noyau et sa localisation dans les CB serait dépendant de son interaction avec des protéines telles que ZPR1 et la coiline. La localisation cytoplasmique de la protéine SMN

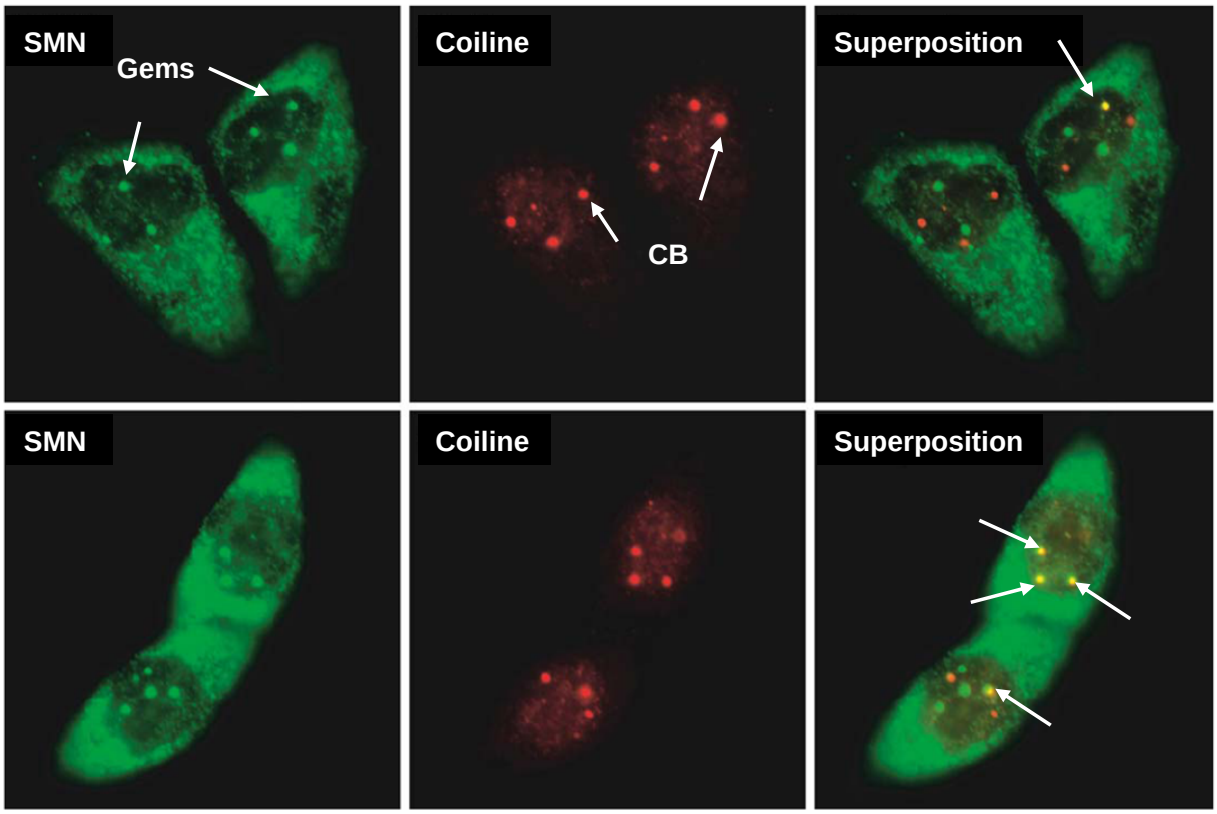


Figure 9 : Les Gems : des structures nucléaires liées aux CB

Mise en évidence des Gems par des expériences de double immunofluorescence dans des cellules HeLa (souche PV) avec des anticorps dirigés contre la protéine SMN (vert) et la coiline p80 (rouge). La protéine SMN présente une localisation diffuse dans le cytoplasme et plus localisée dans le noyau où elle se concentre dans les Gems. La coiline p80 est le marqueur moléculaire définissant spécifiquement les Corps de Cajal (CB). Les Gems et les CB sont indiqués par des flèches. Le résultat de la superposition apparaît en jaune. D'après la revue, Gubitz et al, 2004.

serait, quant à elle, assurée par le domaine codé par l'exon 7 de la protéine qui contient un signal d'adressage cytoplasmique QNQKE. Ainsi, l'ajout d'une telle séquence à la protéine SMNΔexon7, qui s'accumule dans le noyau, lui confèrerait la capacité de résider dans le cytoplasme (Zhang et al, 2003). Certaines expériences d'immunofluorescence ont permis de localiser la protéine SMN dans le nucléole (Francis et al, 1998 ; Young et al, 2001; Wehner et al, 2002). Cependant, cette localisation nucléolaire n'a pu être observée qu'avec certains anticorps dirigés contre la protéine SMN, c'est pourquoi elle reste controversée.

2/ Composition du complexe SMN

In vivo, la protéine SMN est associée à plusieurs protéines, nommées Gemin 2 à Gemin 8 et unrip pour former un complexe multi-protéique appelé complexe SMN (pour revues, Gubitz et al, 2004 et Pellizzoni, 2007).

2.1/ Caractéristiques des protéines du complexe SMN (Tableau III)

La protéine Gemin 2/SIP1 est une protéine de 31,5 kD (Fischer et al, 1997 ; Liu et al, 1997) qui s'associe à la région N-terminale de la protéine SMN (Liu et al, 1997 ; Wang & Dreyfuss, 2001 ; Young et al, 2000 et pour revue, Paushkin et al, 2002). La protéine Gemin 2 a la capacité de s'auto-associer (Ogawa et al, 2007). La mise en place des interactions Gemin2/Gemin2 et Gemin2/SMN au sein du complexe SMN stabiliserait l'oligomérisation de la protéine SMN (Ogawa et al, 2007). La protéine Gemin 2 semble donc nécessaire à la stabilité et à la structuration du complexe SMN (Ogawa et al, 2007 et pour revue, Paushkin et al, 2002).

La protéine Gemin 3/DP103/DDX20 porte un motif DEAD, qui tire son nom d'une courte séquence conservée de quatre acides aminés (aspartate-glutamate-alanine-aspartate), qui est retrouvée dans beaucoup de protéines avec une activité d'ARN hélicase (pour revue, Jankowsky & Fairman, 2007). Cette protéine de 103 kD interagit directement avec la région C-terminale de la protéine SMN (Charroux et al, 1999 ; Campbell et al, 2000).

Gemin 3 pourrait donc avoir une activité d'ARN hélicase au sein du complexe SMN. Cependant, une telle activité reste à démontrer.

La protéine Gemin 4/GIP1 est une protéine de 120 kD qui migre comme une protéine de 97 kD. Elle ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues (Charroux et al, 2000) et contient un NLS à son extrémité N-terminale (Lorson et al, 2008). Bien que sa fonction reste inconnue, son étroite interaction avec la protéine Gemin 3 laisse suggérer qu'elle puisse jouer un rôle de cofacteur dans l'activité ATPasique et/ou hélicase de cette dernière. Les protéines Gemins 3 et 4 sont également associées, chez l'homme, aux complexes miRNP comprenant la protéine eIF2C2 (*eukaryotic Inititation Factor 2C*), une protéine de la famille des Argonautes (Ago2) et des miRNA (micro-ARN), ceci indépendamment du complexe SMN (Mourelatos et al, 2002 ; Dostie et al, 2003 ; Nelson et al, 2004). Les protéines Gemins 3 et 4 pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes par les miRNA (Maniataki & Mourelatos, 2005).

La protéine Gemin 5/p175 est la plus grande protéine du complexe SMN avec une masse moléculaire de 175 kD. Gemin 5 est une protéine à multiples domaines. Elle comporte un motif en hélice α *coiled coil* dans sa partie C-terminale et une répétition de 13 motifs tryptophane-arginine (WD) dans sa partie N-terminale, suggérant sa capacité à former de multiples interactions protéines-protéines (Gubitz et al, 2002).

Les protéines Gemin 6 et 7 sont les plus petites protéines du complexe SMN (16 et 15 kD respectivement) et forment un hétérodimère au sein du complexe SMN (Pellizzoni et al, 2002a ; Baccon et al, 2002). La protéine Gemin 7 interagit avec la protéine SMN grâce à des répétitions de résidus RG présent dans sa partie N-terminale (Baccon et al, 2002). Ces deux protéines ne présentent aucune homologie de séquences avec d'autres protéines répertoriées dans les banques de données, mais leurs structures révèlent des repliement similaires à ceux observés pour les domaines Sm des protéines Sm, que nous détaillerons dans un prochain paragraphe (Ma et al, 2005).

La protéine Gemin 8 est une protéine de 32 kD nécessaire à l'association de l'hétérodimère formé par les protéines Gemin 6/7 au complexe SMN. Plusieurs orthologues de la protéine Gemin 8 humaine ont été trouvés dans divers organismes (chien, rat, souris, taureau, xénope, poisson zèbre et la levure *C. elegans*). Par contre, aucun orthologue de la protéine Gemin 8 n'a été identifié chez la drosophile et la levure *S. pombe*, alors que ces

Protéine	Masse moléculaire (kD)	Localisation	Motifs et domaines structuraux	Interaction avec	Références
SMN	37	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems et nucléole (?)	Boîte Y/G, domaine Tudor régions riches en prolines	SMN, Gemin 2 SmB, D1, D3	(Lefebvre et al, 1995; Liu et al, 1997; Friesen & Dreyfuss, 2000; Lorson et al, 1998; Pellizzoni et al, 1999).
Gemin 2 (SIP1)	31,5	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	-	SMN	(Liu et al, 1997)
Gemin 3 (DP103)	103	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	Boîte DEAD, composant des miRNP	SMN Gemin4 SmB/B', D1-3, SmE	(Charroux et al, 1999; Charroux et al, 2000)
Gemin 4 (GIP1)	97 (120)	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems, nucléole	composant des miRNP	Gemin3 SmB/B', D1-3, SmE	(Charroux et al, 1999)
Gemin 5 (p175)	175	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	Répétitions WD, « coiled-coil »	SMN SmB/B', D1-3, SmE	(Meister et al, 2001a; Gubitz et al, 2002)
Gemin 6	16	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	-	Gemin 7 et 8 SmD2, E, B, D3	(Pellizzoni et al, 2002a; Baccon et al, 2002)
Gemin 7	15	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	Répétitions RG	SMN Gemin 6 et 8 SmE, B, D2, D3	(Baccon et al, 2002)
Gemin 8	32	Cytoplasme, nucléoplasme, Gems	-	SMN, Gemin 6/7	(Carissimi et al, 2006a)
Unrip	38	Cytoplasme	Répétitions WD	SmB, D2 et D3, SmE (plus faiblement) Gemin6/7	(Carissimi et al, 2005 ; Grimmler et al, 2005)

Tableau III : Caractéristiques des composants du complexe SMN

La protéine SMN appartient à un large complexe macromoléculaire contenant 9 composants protéiques. D'après la revue, Gubitz et al, 2004.

deux espèces contiennent la protéine SMN et que leurs génomes ont été entièrement séquencés (Carissimi et al, 2006a ; Carissimi et al, 2006b).

La protéine unrip (*unr-interacting protein*) est une protéine de 38 kD qui contient des motifs tryptophane-arginine (WD) comme la protéine Gemin 5 (Carissimi et al, 2005 ; Grimmler et al, 2005). La protéine unrip a été précédemment décrite comme une protéine qui forme un complexe avec UNR (*Upstream of N-Ras*), un facteur impliqué dans la régulation de la traduction indépendante de la coiffe des ARNm (Hunt et al, 1999 ; Mitchell et al, 2003). En absence de la protéine unrip, la protéine SMN est accumulée dans les Gems/CB suggérant alors un rôle de celle-ci dans la localisation intracellulaire de la protéine SMN (Grimmler et al, 2005 ; Petri et al, 2007).

2.2/ Structure et organisation du complexe SMN

Le complexe SMN est un large complexe qui a un coefficient de sédimentation compris entre 40 S et 60 S sur gradient de saccharrose (pour revue, Paushkin et al, 2002). Cette hétérogénéité de taille reflète probablement sa capacité d'interaction avec différents composés cellulaires. La plupart des protéines interagissant avec la protéine SMN et les composés du complexe sont répertoriés dans le ***tableau IV***. Au fur et à mesure de cette introduction, j'expliciterai en détails la majorité de ces interactions et leur rôle fonctionnel démontré ou hypothétique. Le complexe SMN est également résistant à de fortes concentrations en sels et en détergent (Pellizzoni et al, 2002a). La ***figure 10*** donne un schéma général du complexe SMN en tenant compte de sa composition et des interactions décrites. La stoechiométrie des divers composants reste à ce jour encore inconnue. Au sein du complexe, les protéines Gemin 2, 3, 5, 7 et 8 interagissent directement avec la protéine SMN, alors que Gemin 4 s'y associe par liaison avec Gemin 3, Gemin 6 s'y associe par liaison avec Gemin 7 et la protéine unrip s'y associe par liaison à l'hétérodimère formé des protéines Gemin 6 et 7 (pour revue, Pellizzoni, 2007). De plus, d'autres interactions plus faibles, entre les composants du complexe, pourraient le stabiliser (Otter et al, 2007).

La majorité des protéines du complexe SMN colocalisent avec la protéine SMN dans les Gems/CB et dans le cytoplasme (pour revue, Gubitz et al, 2004) à l'exception des protéines Gemin 5 et unrip qui en sont absentes dans la plupart des cellules.

Partenaires de la protéine SMN ou du complexe SMN	Motifs et domaines	Interactions avec SMN direct (+) ou indirecte (-)	Fonctions	Références
Composant du complexe SMN				
Gemin 2 (SIP1)	-	+	Assemblage des UsnRNP	(Liu et al, 1997)
Gemin 3 (DP103)	Boîte DEAD	+		(Charroux et al, 1999; Charroux et al, 2000)
Gemin 4 (GIP1)	Leucine zipper	-		(Charroux et al, 1999)
Gemin 5 (p175)	Répétitions WD « coiled coil »	+		(Meister et al, 2001a; Gubitz et al, 2002)
Gemin 6	-	-		(Pellizzoni et al, 2002a; Baccon et al, 2002)
Gemin 7	Répétitions RG	+		(Baccon et al, 2002)
Gemin 8	-	+		(Carissimi et al, 2006a)
Unrip	Répétitions WD	-		(Carissimi et al, 2005; Grimmler et al, 2005)
Protéines cellulaires				
Protéines Sm	Motif Sm, répétitions RG	+	Protéines des UsnRNPs et épissage des ARN pré-messagers	(Liu et al, 1997 ; Buhler et al, 1999 ; Charroux et al, 1999 ; Friesen & Dreyfuss, 2000 ; Gubitz et al, 2002 ; Pellizzoni et al, 2002a ; Pellizzoni et al, 2002b)
Lsm4/Lsm6	Motif Sm, répétitions RG	+	Protéines de la snRNP U6 et dégradation des ARN	(Friesen & Dreyfuss, 2000; Brahms et al, 2001)
Fibrillarine	Boite RGG, domaine de méthyltransférase	+	Protéines des snoRNPs	(Jones et al, 2001; Pellizzoni et al, 2001a ; Wehner et al, 2002)
GAR1	Boite RGG	+		(Pellizzoni et al, 2001a; Whitehead et al, 2002)
ZPR1 *(Zinc finger Protein1)*	Doigt de zinc	-	Assemblage/maturation des UsnRNPs (?)	(Gangwani et al, 2001 ; Gangwani et al, 2005 ; Doran et al, 2006)
Coiline	Répétitions RG	+	Marqueur des CB, recrutement de SMN et UsnRNP dans les CB (?)	(Hebert et al, 2001 ; Hebert et al, 2002; Xu et al, 2005a)
hnRNP-Q et R	RRM, boîte RGG	+	Transport d'ARN le long des axones	(Rossoll et al, 2002; Mourelatos et al, 2001)
Snurportin-1 et importin-β	Domaines IBB et TMG	**+ et -**	Transport des UsnRNPs dans le noyau	(Massenet et al, 2002; Narayanan et al, 2002)
CRM1		?	Facteur d'export nucléaire	(Sleeman, 2007)
KSRP *(KH type Splicing Regulatry Protein)*, FBP2, ZBP2	Domaines KH, RG et PGM	+	Régulation de l'épissage, transport des ARNm dans les neurones	(Tadesse et al, 2008)
FBP *(Fuse Binding protein)*		?	Régulateur de la transcription et stabilité des ARN messagers	(Williams et al, 2000)
FMRP *(Fragile X Mental Retardation Protein)*	Domaines KH1 et KH2, boîte RGG	+	Régulation de la synthèse protéique locale	(Piazzon et al, 2008)
Nucléoline et B23	RRM	-	Contrôle de la croissance et de la prolifération de cellules, apoptose, transduction de signal de surface, différentiation et maintenance des tissus neuraux	(Lefebvre et al, 2002)
FGF-2 *(Fibroblast Growth Factor 2)*		+	Facteur neurotrophique pour les motoneurones	(Claus et al, 2003 ; Claus et al, 2004)
TGS1 *(TriméthylGuanosine Synthase 1)*	méthylase	+	Hyperméthylation de la coiffe des UsnRNA pol II	(Mouaikel et al, 2003a)
Tim50a		+	Phosphatase	(Xu et al, 2005b)
p53		+	Apoptose	(Young et al, 2002a)

FRG1P		-	Biogenèse des ARN (?)	(van Koningsbruggen et al, 2007)
CA150	Domaines PGM, WW et FF	+	Facteurs d'épissage et de la transcription	(Cheng et al, 2007)
NFAR-2 (*Nuclear Factor Associated with dsRNA*)	Motifs de fication aux ARN double brins, région d'homologie avec eIF2α	**?**	Métabolisme des ARNm	(Saunders et al, 2001)
ARN hélicase A	Boîte DEAD, boîte RGG, dsRBD	+	Transcription	(Pellizzoni et al, 2001b)
ARN polymérase II (CTD)	Boite DEAH, hélicase ARN	-		(Pellizzoni et al, 2001b)
mSin3A	Domaines PAH	**?**	Régulation transcriptionnelle	(Zou et al, 2004)
EWS *(Ewing Sarcoma)*		+		(Young et al, 2003)
BRUNOL3 (CELF2, ETR-3, CUG-BP2)		**?**	Régulation de la traduction et de la stabilité des ARNm	(Anderson et al, 2004)
Profiline		+	Contrôle de la dynamique de l'actine	(Giesemann et al, 1999; Sharma et al, 2005; Bowerman et al, 2007)
Protéines virales				
Papilloma virus E2		+	Régualtion de la transcription et de la réplication du virus	(Strasswimmer et al, 1999)
Virus minute NS1 et NS2		?	Réplication virale et activateur transcriptionnel	(Young et al, 2002b; Young et al, 2002c)
Antigène nuclaire du virus d'Epstein-Barr EBNA2 et EBNA3C		?	Régulation transcriptionnelle	(Barth et al, 2003; Krauer et al, 2004)

Partenaires du complexe SMN	Motifs et domaines	Intéractions avec	Fonctions	Références
PPM1G/PP2Cγ		SMN, Gemin 3	Déphosphorylation	(Petri et al, 2007)
eIF4E		Gemin 5	Facteur d'initiation de la traduction	(Fierro-Monti et al, 2006)
ASK-1 *(Apoptosis Signal-regulating Kinase-1)*			Apoptose, différentiation cellulaire	(Kim et al, 2007)
Galectine 1 et 3		Gemin 4	Epissage	(Park et al, 2001)
METS		Gemin 3	Facteur de transcription (régulation de la prolifération et de la différentiation)	(Klappacher et al, 2002)
SF-1 *(Steroidogenic Factor-1)*			Facteur de transcription (régulation des fonctions endocrines et de reproduction)	(Ou et al, 2001; Lee et al, 2005)
Egr 1, 2 , 3 et 4	Doigts de zinc (3)		Facteurs de transcription	(Gillian & Svaren, 2004)
eIF2C2 *(eukaryotic Initiation Factor 2C)*	Domaines PAZ et PIWI	Gemin 3, 4	Contrôle de l'expression des gènes	(Mourelatos et al, 2002; Nelson et al, 2004)
PPP4 *(Protein Phosphatase 4)*		Gemin 3, 4	Déphosphorylation des résidus sérine et thréonine	(Carnegie et al, 2003)
HIV1-IN (*HIV-1 integrase*)		Gemin 2	Infectivité du virus HIV	(Hamamoto et al, 2006)
UNR (*Upstream of N-Ras*)	Domaines CSD (*cold shock domain*)	Unrip	Régulation de la traduction	(Hunt et al, 1999; Mitchell et al, 2003)

Tableau IV : Les protéines du complexe SMN interagissent avec un grand nombre de partenaires transitoires

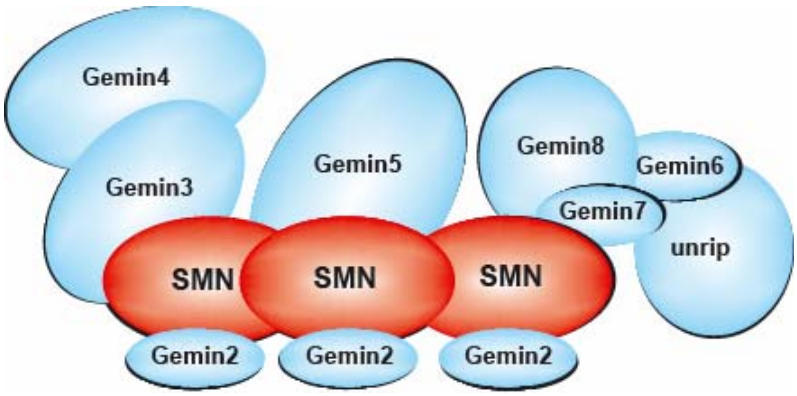


Figure 10 : Représentation schématique du complexe SMN

Le complexe SMN est constitué d'au moins neuf protéines nommées SMN, Gemin 2 à Gemin 8 et unrip. La protéine SMN se lie aux protéines Gemin 2, 3, 5, 7 et 8, tandis que les protéines Gemin 4 et Gemin 6 s'associent au complexe SMN par leurs interactions respectives avec la protéine Gemin 3 ou la protéine Gemin 7. La protéine Gemin 8 serait nécessaire à l'association des protéines Gemin 6 et Gemin 7 au complexe SMN, lesquelles s'associent à la protéine unrip. Par souci de simplicité, ce complexe est présenté sous une forme simplifiée, car il forme, probablement, des oligomères d'ordre supérieur *in vivo.* D'après la revue, Pellizzoni, 2007.

Les protéines Gemin 5 et unrip sont principalement localisées dans le cytoplasme sous forme non-associées à la protéine SMN (Carissimi et al, 2005 ; Grimmler et al, 2005 ; Hao le et al, 2007 ; Battle et al, 2007). Par conséquent, seule une faible proportion de ces protéines semble faire partie du complexe SMN et ceci uniquement dans le cytoplasme. Plusieurs études ont d'ailleurs révélé l'existence de sous-complexes stables indépendant du complexe SMN. Ainsi des analyses par sédimentation en gradient de saccharose et par immunosélection ont montré que les protéines Gemin 6/7 et unrip forment un complexe stable dans les cellules et que leur association au complexe SMN requiert la présence de la protéine Gemin 8 (Carissimi et al, 2006b ; Battle et al, 2007). De même, un complexe formé des protéines Gemin 3, Gemin 4 et Gemin 5 existe sans la protéine SMN (Battle et al, 2007). Enfin, comme indiqué précédemment, les protéines Gemin 3 et 4 pourraient être associées aux miRNP (Mourelatos et al, 2002 ; Dostie et al, 2003 ; Nelson et al, 2004). En résumé, il est possible que certaines protéines Gemin jouent des rôles autres que ceux qu'elles occupent au sein du complexe SMN dans les cellules.

III/ Rôles ubiquitaires du complexe SMN

1/ Rôle du complexe SMN dans l'assemblage des UsnRNP

1.1/ Biogenèse des pré-UsnRNP

1.1.1/ La réaction d'épissage (pour revues, Moore et al, 1993 ; Shao & Kent, 1997)

Les produits de transcription primaire des gènes des eucaryotes contiennent des séquences excédentaires (les introns) et des séquences qui sont réunies entre elles au sein de l'ARN pré-messager (les exons). Après leur synthèse par l'ARN polymérase II, les ARN pré-messagers sont soumis à différentes étapes de maturation afin d'être convertis en ARN messagers (ARNm) fonctionnels. L'étape d'épissage, qui consiste à éliminer les introns, est conditionnée par l'existence de séquences consensus situées aux bornes et à l'intérieur de

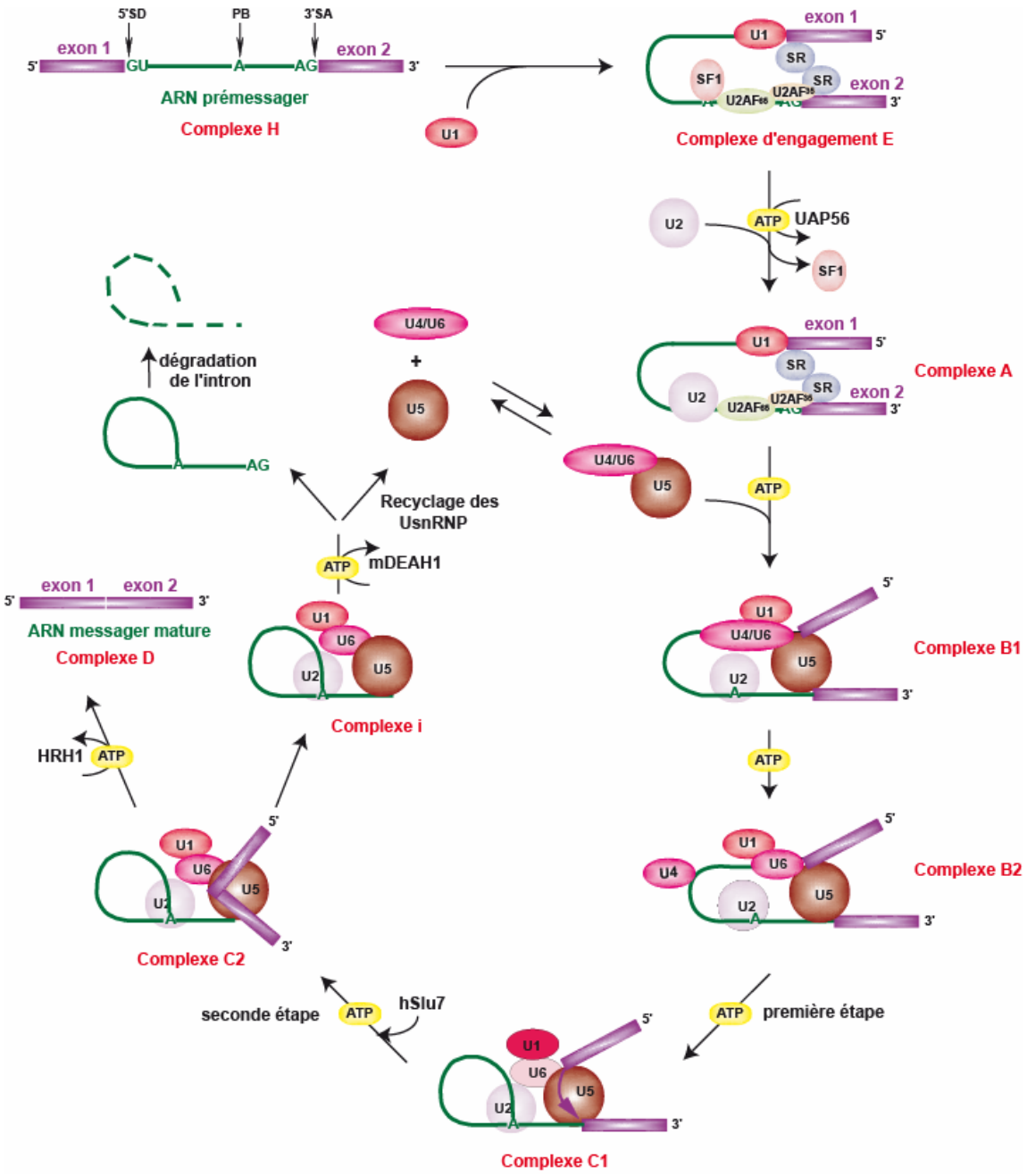


Figure 11 : Représentation schématique du cycle d'épissage par le spliceosome

Les complexes snRNPs spliceosomaux (U1, U2, U4, U5 et U6) s'associent avec l'ARN pré-messager dans un ordre séquentiel précis pour former le spliceosome. Ce large complexe ribonucléoprotéique catalyse deux réactions de transestérification permettant l'épissage des exons (rectangles violets) et l'excision de l'intron (ligne verte). L'hydrolyse de l'ATP n'est pas requise pour les réactions de transestérification mais est nécessaire aux réarrangements structuraux du spliceosome qui s'effectuent au cours du cycle. Les étapes "ATP" dépendantes sont indiquées par un ATP encerclé. 5'SD et 3'SA représentent, respectivement, les sites 5' et 3' d'épissage. PB est le point de branchement. Pour revue, Moore et al, 1993.

l'intron. L'intron contient en plus une séquence interne, appelée boîte de branchement ***(Figure 11)***. Cette boîte de branchement comporte un résidu adénosine qui joue un rôle central dans le processus d'épissage. La réaction d'épissage comporte deux étapes, avec tout d'abord, une attaque nucléophile du 2'-OH du ribose du résidu adénosine de la boîte de branchement sur le phosphate de la jonction exon-intron en 5' de l'intron. Le 3'-OH de l'exon libéré attaque ensuite le phosphate de la jonction intron-exon en aval de l'intron. Les produits de cette réaction sont d'une part les deux exons liés de manière covalente et d'autre part, l'intron libre sous forme de lasso (ou : *lariat*). La structure en lasso est finalement ouverte par une enzyme dite de débranchement afin de pouvoir être hydrolysée ce qui déplace l'équilibre vers un épissage total.

L'épissage de l'ARN pré-messager est catalysé par un large complexe ribonucléoprotéique de 60 S appelé le spliceosome. Ce complexe s'assemble autour de l'intron et des bordures exoniques. Le spliceosome renferme un très grand nombre de protéines et les particules UsnRNP. Chaque UsnRNP est composée d'un (U1, U2, U5) ou de deux petits ARN (U4/U6) contenant moins de 200 nucléotides appelés UsnRNA (*U rich small nuclear RNA*). Les snRNA U1, U2, U4 et U5 contiennent une séquence en simple brin riche en uridines (U rich), entourée de 2 structures en épingle à cheveux qui forment le site de fixation des protéines Sm dont la séquence codante conservée est PuAU4-6GPu (Branlant et al, 1982) ***(Figure 12)***. Les UsnRNA s'associent aux 7 protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) pour former des complexes appelés pré-UsnRNP (***Figure 13)*** (Kambach et al, 1999).

Le snRNA U6, quant à lui, ne s'associe pas aux protéines Sm. Il contient une séquence courte et riche en résidus uridines à son extrémité 3' (Rinke et al, 1985 ; Kunkel et al, 1986) ***(Figure 12)***. Cette séquence forme un site de fixation d'une structure heptamérique en anneau composée de protéines Lsm (*Sm-like*) similaire à celui formé par les protéines Sm (Achsel et al, 1999).

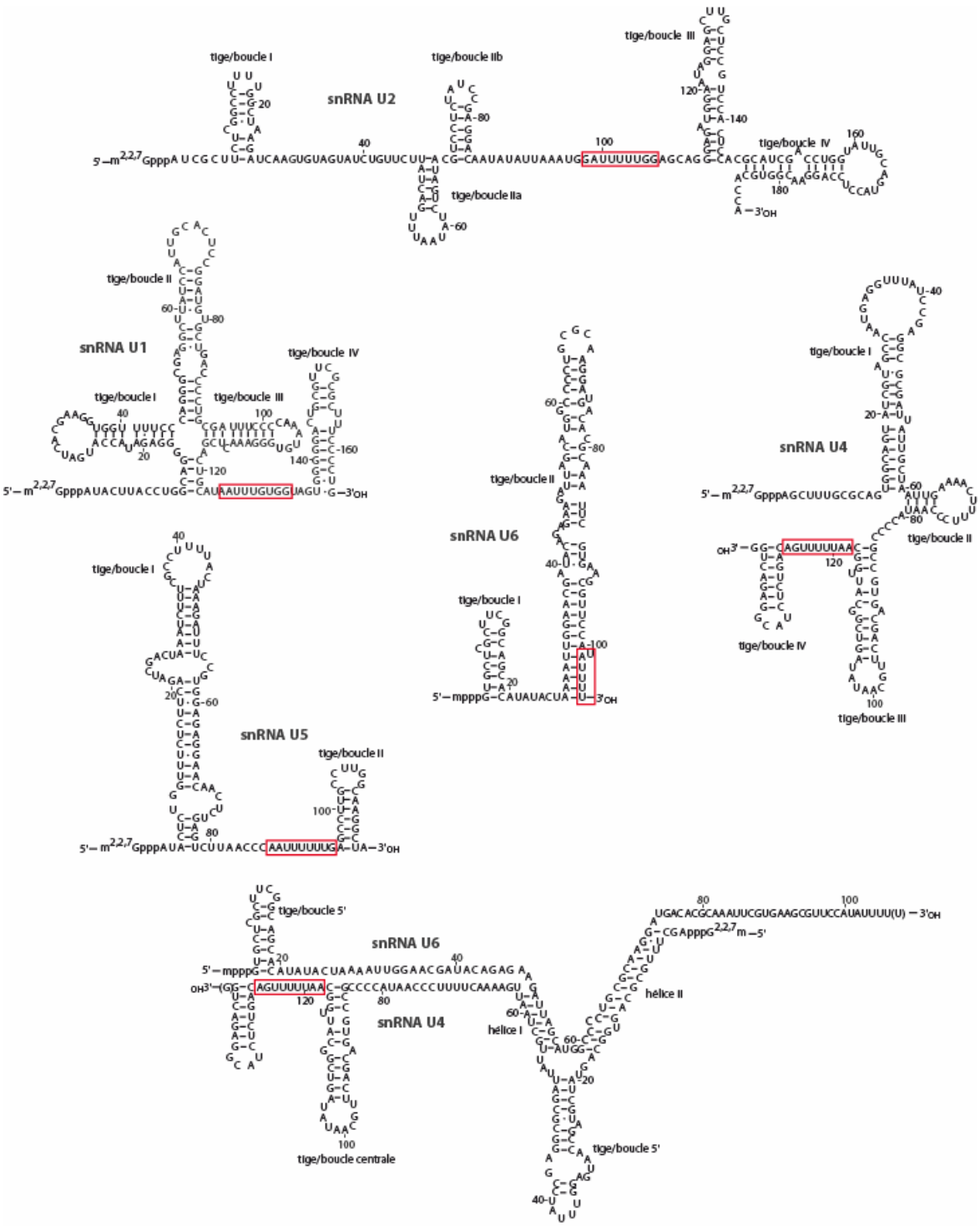


Figure 12 : Séquences et structures secondaires des UsnRNA humains majeurs

Ces structures secondaires ont été établies à partir de celles déterminées expérimentalement chez le rat (Branlant et al, 1980 ; Mount & Steitz, 1981) pour le snRNA U1, (Branlant et al, 1982) pour le snRNA U2, (Krol et al, 1981) pour le snRNA U4 et (Branlant et al, 1983) pour le snRNA U5. La structure secondaire du snRNA U6 humain a été établie par Mougin et al, 2002. Enfin, la structure secondaire du duplex U4/U6 a été établie par Brow & Guthrie, 1988 et Mougin et al, 2002. Le site Sm permettant la fixation des protéines Sm (Branlant et al, 1982) ou Lsm (Achsel et al, 1999) est encadré en rouge dans les différents UsnRNA.

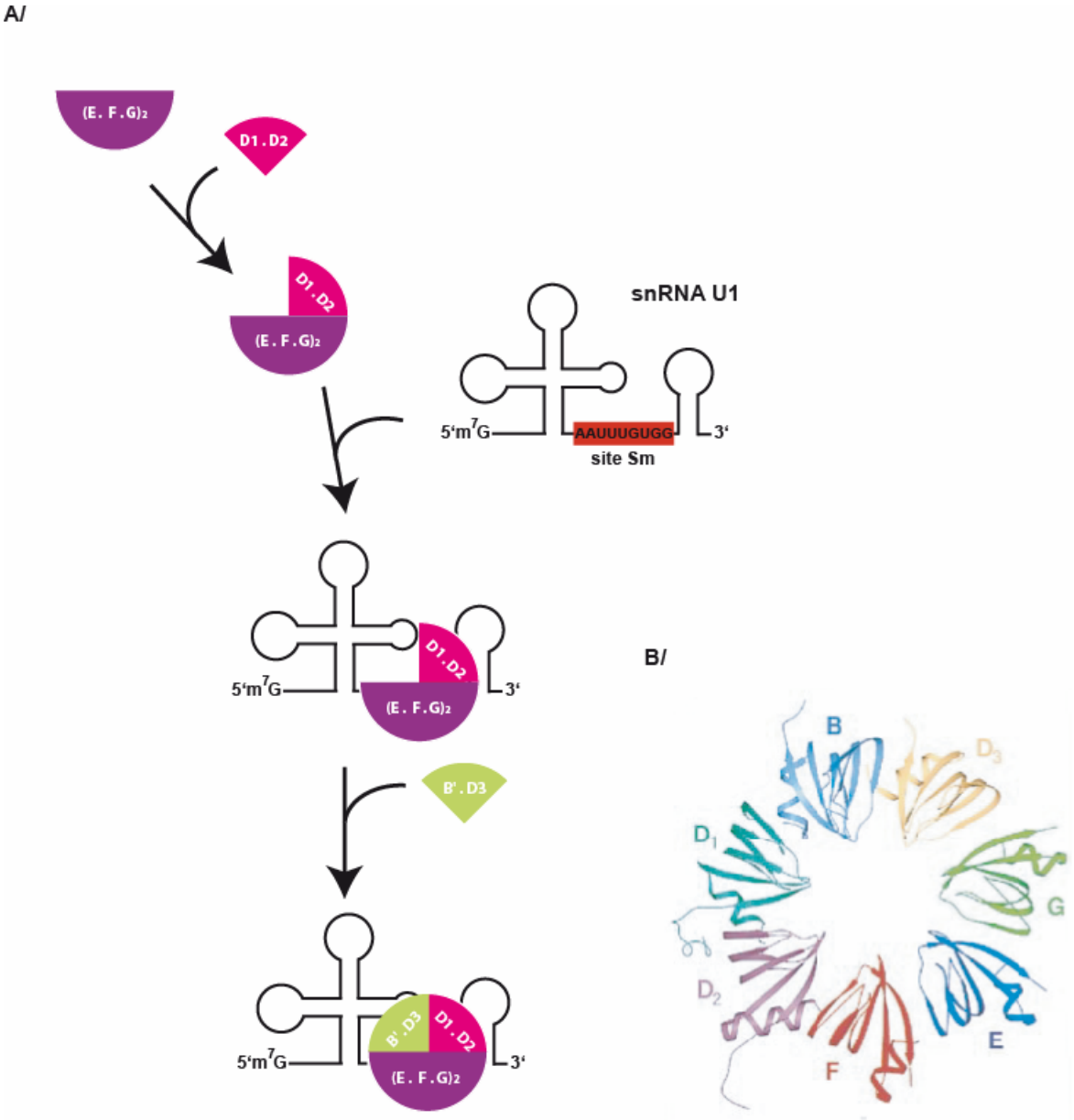


Figure 13 : Organisation structurale du complexe formé par les protéines Sm

A/ Modèle d'assemblage des particules UsnRNP établi à partir d'expériences *in vitro*. Deux complexes stables sont formés entre les protéines Sm D1 et D2 (Lehmeier et al, 1994), d'une part, et entre les protéines Sm E, F et G (Raker et al, 1996), d'autre part. Ces deux sous-complexes s'associent aux UsnRNA pour former un pré-complexe, puis les protéines Sm B/B' et D3 viennent compléter l'assemblage des UsnRNP (Hermann et al, 1995). **B/** Structure en anneau de l'heptamère formé par les 7 protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F, G). Cette organisation a été proposée par Kambach et al. (1999) à partir des structures 3D des complexes D1/D2 et D3/B établies par radiocristallographie (Kambach et al, 1999) et des interactions entre protéines Sm définies par des analyses biochimiques et génétiques (Camasses et al, 1998 ; Raker et al, 1996 ; Fury et al, 1997).

1.1.2/ Transcription et export des UsnRNA néo-synthétisés

La biogenèse des snRNP U1, U2, U4 et U5 matures et fonctionnelles est un processus complexe qui se déroule, chez les eucaryotes supérieurs, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (pour revue, Will & Luhrmann, 2001) ***(Figure 14)***. Les snRNA U1, U2, U4 et U5 sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le noyau et portent une coiffe monométhylée (m^7G) en 5' et des nucléotides additionnels à leur extrémité 3'. Les UsnRNA sont ensuite exportés dans le cytoplasme. Pour cela, leur coiffe est reconnue par le complexe CBC (*Cap Binding Complex*), un complexe hétérodimérique composé de deux sous-unités, CBP20 et CBP80 (*Cap Binding Protein 20 and 80*) (Izaurralde et al, 1994 ; Kataoka et al, 1994 ; Izaurralde et al, 1995 ; Kataoka et al, 1995). La protéine PHAX (*Phosphorylated adaptator of RNA export*) s'associe ensuite à la fois au complexe CBC et au UsnRNA (Ohno et al, 2000). Dès lors, la phosphorylation de PHAX permet à l'ensemble de ce complexe de recruter et d'interagir avec le facteur d'export CRM1-RanGTP (*Chromosome Maintenance Region-1*). Celui-ci reconnaît le signal NES (*Nuclear Export Signal*) porté par la protéine PHAX (Ohno et al, 2000). Une fois le transport effectué vers le cytoplasme par le pore nucléaire, le complexe d'export est dissocié suite à l'hydrolyse de RanGTP en RanGDP et la déphosphorylation de PHAX (Ohno et al, 2000).

1.1.3/ Assemblage et ré-import dans le noyau des complexes pré-UsnRNP

Après l'export des UsnRNA dans le cytoplasme, les protéines Sm sont assemblées autour du site Sm des UsnRNA pour former les pré-UsnRNP. L'assemblage correct des protéines Sm est primordial au recrutement de l'hyperméthylase TGS1, qui catalyse la transformation de la coiffe m^7G en 2, 2, 7-triméthylguanosine (m^3G) et à la maturation de l'extrémité 3' de l'ARN. Les pré-UsnRNP sont, ensuite, réimportées dans le noyau. La coiffe et le domaine Sm de chacun des UsnRNA forment un signal de localisation nucléaire bipartite (Fischer & Luhrmann, 1990 ; Fischer et al, 1994 ; Marshallsay & Luhrmann, 1994). Ce signal bipartite est spécifiquement reconnu par la snurportin-1 qui interagit avec le facteur d'import nucléaire : importin-β (Huber et al, 1998). Les pré-UsnRNP s'accumulent ensuite de manière transitoire dans les CB. Dans ces corpuscules, les snRNA

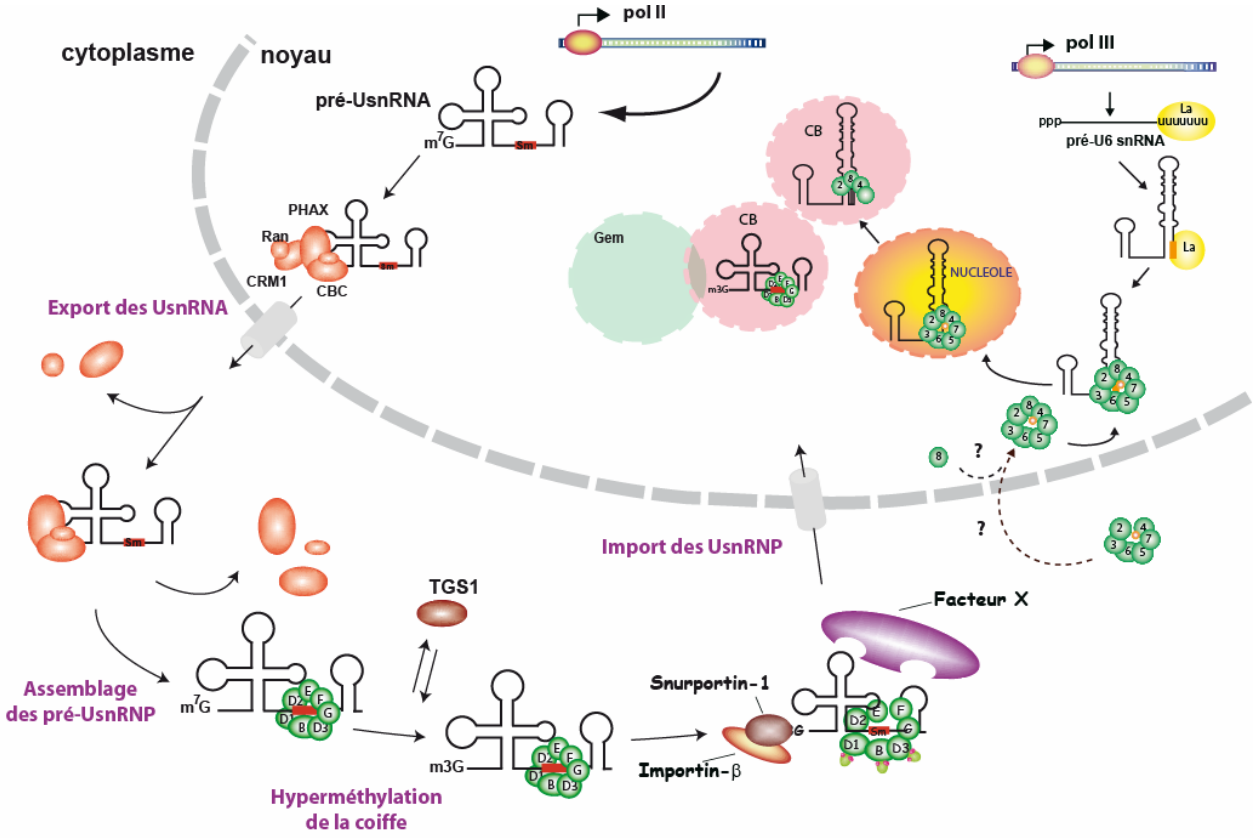


Figure 14 : Biogenèse des UsnRNP

Les snRNA U1, U2, U4 et U5 sont transcrits par l'ARN polymérase II et contiennent des nucléotides supplémentaires à leur extrémité 3', ainsi qu'une structure coiffe monométhylée (m^7G) à leur extrémité 5'. Leur structure coiffe est reconnue par le complexe nucléaire de liaison à la coiffe (CBC ou *Cap Binding Complex*), composé de CBP20 et CBP80. La protéine adaptatrice PHAX (*Phosphorylated adaptator of RNA export*) se lie à CBC et aux snRNA U1, U2, U4 et U5, permettant alors l'interaction avec le récepteur d'export CRM1/Exportin1. CRM1 associé à RanGTP permettent l'export des UsnRNA nouvellement synthétisés dans le cytoplasme. Après l'hydrolyse du GTP de Ran et la déphosphorylation de PHAX, les protéines Sm viennent se lier au site Sm des UsnRNA, générant alors des particules pré-UsnRNP. Cette étape est requise pour l'hyperméthylation de la coiffe et la maturation de l'extrémité 3' des UsnRNA. La structure coiffe triméthylée lie la snurportin-1, qui interagit ensuite avec le récepteur d'import (importin-β) et avec un autre récepteur d'import qui reconnait les protéines Sm. Les pré-UsnRNP seraient alors importées dans le noyau. Le snRNA U6 est transcrit par l'ARN polymérase III. Il contient à son extrémité 3' une séquence riche en U, nécessaire à l'interaction avec la protéine La et une coiffe γ-méthylée à l'extrémité 5'. La protéine La s'associe au snRNA U6 dès sa transcription et est ensuite remplacée par les protéines Lsm, dont on ne connaît pas encore bien le mode d'assemblage. Ces protéines Lsm formeraient également un anneau heptamérique similaire à celui formé par les protéines Sm. L'association des protéines Lsm au snRNA U6 est indispensable au transport dans le nucléole des pré-UsnRNP nouvellement formées où elles subissent des modifications post-transcriptionnelles. Leur maturation est achevée lors du transit dans les CB. Adapté de la revue, Pellizzoni, 2007.

U1, U2, U4 et U5 subissent des modifications post-transcriptionnelles dont la plupart, chez les vertébrés, serait ciblée par des petits ARN guides spécifiques des CB (scaRNA ou *small cajal body RNA*) (pour revue, Kiss, 2004). Certaines de ces modifications, principalement des pseudouridylations et des 2'-O méthylations seraient importantes pour l'assemblage et/ou le fonctionnement du spliceosome (Jady & Kiss, 2001 ; Yu et al, 1998 ; Massenet et al, 1998). Enfin, les protéines spécifiques de chaque UsnRNP, concentrées dans les CB, s'associeraient pour former des particules UsnRNP matures qui seraient soit, assemblées tout de suite en spliceosome, soit accumulées dans des structures de la région interchromatinienne appelées IGC (*Interchromatin Granules Cluster*) ou «speckles». Ces structures IGC sont généralement localisées à proximité des sites actifs de transcription et ont plusieurs fonctions dont le stockage/relarguage de facteurs ou protéines impliqués dans les processus de transcription et d'épissage.

Chez les vertébrés, le snRNA U6 est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase III et acquiert une coiffe γ-monométhylée ***(Figure 14)*** (pour revue, Dahlberg & Lund, 1987). L'assemblage de cette UsnRNP se déroule exclusivement dans le noyau. La première protéine qui s'associe au snRNA U6 après sa transcription est la protéine La. Cette protéine interagit avec une séquence courte et riche en résidus uridines de l'extrémité 3' du snRNA U6 (Rinke et al, 1985 ; Kunkel et al, 1986). Ceci permet la stabilisation du UsnRNA et facilite l'assemblage de la UsnRNP (pour revue, Wolin & Cedervall, 2002). Après conversion de l'extrémité 3' hydroxyle du snRNA U6 en 2'-3' phosphate cyclique (Lund & Dahlberg, 1992 ; Terns et al, 1992), la protéine La est remplacée par les protéines Lsm : Lsm2, Lsm3, Lsm4, Lsm5, Lsm6, Lsm7 et Lsm8 (Seraphin, 1995 ; Pannone et al, 1998 ; Mayes et al, 1999 ; Salgado-Garrido et al, 1999 ; Achsel et al, 1999) qui forment un complexe heptamérique autour de l'extrémité 3' du snRNA U6 (Achsel et al, 1999). Contrairement aux autres UsnRNA, les modifications post-transcriptionnelles du snRNA U6 sont majoritairement réalisées non pas dans les corps de Cajal mais dans le nucléole, grâce à des snoRNA guides de modifications.

1.2/ Implication du complexe SMN dans ce processus

Bien qu'il soit possible de reconstituer des pré-UsnRNP, *in vitro,* à partir des protéines Sm purifiées et de UsnRNA produits *in vitro* (Sumpter et al, 1992 ; Raker et al, 1996 ; Raker et al, 1999), leur biosynthèse, *in vivo,* est assistée par le complexe SMN. Ce rôle a d'abord été formulé par l'équipe de G. Dreyfuss, sur la base de la découverte d'une association entre les protéines Sm, les UsnRNA et le complexe SMN, dans des extraits totaux de cellules HeLa et dans des oocytes de *Xenopus laevis* (Liu et al, 1997 ; Fischer et al, 1997). Cette hypothèse a ensuite été confortée par des expériences de micro-injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine Gemin 2 et contre le domaine Tudor de la protéine SMN, dans le cytoplasme d'oocytes de *X. laevis,* ce qui a permis de montrer un blocage de l'assemblage des protéines Sm sur les UsnRNA (Fischer et al, 1997 ; Buhler et al, 1999). Par la suite, des travaux réalisés, *in vitro,* avec des extraits de cellules HeLa, d'oocytes de Xénope ou avec le complexe SMN purifié, ont permis de confirmer le rôle essentiel du complexe SMN dans l'assemblage des protéines Sm au site Sm des UsnRNA (Meister et al, 2001a ; Meister et al, 2001b ; Meister et al, 2002 ; Pellizzoni et al, 2002a ; Pellizzoni et al, 2002b). En effet, un extrait dans lequel le complexe SMN a été éliminé n'a plus la capacité d'assembler des pré-UsnRNP, bien que cet extrait contienne toujours des protéines Sm. L'addition du complexe SMN purifié restaure la capacité de l'extrait à former des pré-UsnRNP. Ainsi, dans un extrait cellulaire, seules les protéines Sm associées au complexe SMN sont actives dans l'assemblage des pré-UsnRNP. Dans un prochain paragraphe, nous verrons que les autres protéines Sm sont séquestrées dans deux autres complexes, le méthylosome et le complexe 6S.

In vivo, il semble que chaque protéine du complexe SMN soit nécessaire à l'assemblage des UsnRNP. En effet, plusieurs équipes ont montré un défaut d'assemblage des UsnRNP dans des extraits de cellules HeLa ne contenant pas chacune des protéines du complexe SMN (Feng et al, 2005 ; Shpargel & Matera, 2005 ; Grimmler et al, 2005 ; Carissimi et al, 2005 ; Carissimi et al, 2006b ; Girard et al, 2006 ; Otter et al, 2007).

1.2.1/ Le complexe SMN interagit à la fois avec les protéines Sm et les UsnRNA

Afin de jouer son rôle dans l'assemblage des UsnRNP, le complexe SMN s'associe à la fois aux protéines Sm et aux UsnRNA.

- ***Les bases moléculaires de l'interaction entre le complexe SMN et les protéines Sm***

Chaque protéine du complexe SMN, excepté Gemin 2 et Gemin 8, se lie directement aux protéines Sm ***(Tableau III, page 34)*** (Baccon et al, 2002 ; Charroux et al, 1999 ; Charroux et al, 2000 ; Gubitz et al, 2002 ; Liu et al, 1997 ; Pellizzoni et al, 2002a). L'interaction de la protéine SMN avec les protéines Sm B/B', D1 et D3 a été l'une des plus étudiée. Ces protéines Sm contiennent une région riche en enchaînements arginine-glycine (RG) à leur extrémité C-terminale ***(Figure 15)***, qui est nécessaire à leur interaction avec la protéine SMN (Friesen & Dreyfuss, 2000). Cette interaction est très fortement stabilisée par la présence de modifications post-traductionnelles dans les protéines Sm B/B', D1 et D3. En effet, certaines arginines de leurs domaines riches en répétitions RG portent des diméthylations symétriques (sDMA) spécifiquement reconnues par la protéine SMN ***(Figure 15)*** (Brahms et al, 2000 ; Brahms et al, 2001 ; Friesen et al, 2001a). Le domaine Tudor correspondant à l'exon 3 de la protéine SMN semble essentiel à l'interaction avec les protéines Sm B, D1 et D3 (Buhler et al, 1999 ; Brahms et al, 2001). Récemment, il a été montré que les domaines Tudor, en général, seraient une plateforme d'interaction avec des protéines contenant des arginines méthylées (Cote & Richard, 2005). De manière intéressante, la présence de la mutation E134K, dans le domaine Tudor de la protéine SMN, affecte la fixation des protéines Sm (Buhler et al, 1999). Cette mutation ne perturbe pas le repliement global du domaine Tudor mais altère la distribution des charges au niveau de sa surface (Selenko et al, 2001). L'oligomérisation de la protéine SMN semble, également, être importante pour son interaction avec les protéines Sm B, D1 et D3. En effet, l'équipe de G. Dreyfuss a montré que l'extrémité C-terminale de la protéine SMN comprenant la boîte Y/G et l'exon 7 gènère un site de haute affinité pour la fixation des protéines Sm (Liu et al, 1997 ; Fischer et al, 1997 ; Mourelatos et al, 2001 ; Wang & Dreyfuss, 2001). La mutation SMNY272C (mutation ponctuelle dans la boîte Y/G), retrouvée chez les patients SMA, présente, d'ailleurs, un défaut d'association aux protéines Sm (Pellizzoni et al, 1999). Le complexe protéique responsable de la méthylation des protéines Sm B/B', D1 et D3 a été identifié. Ce complexe est appelé le

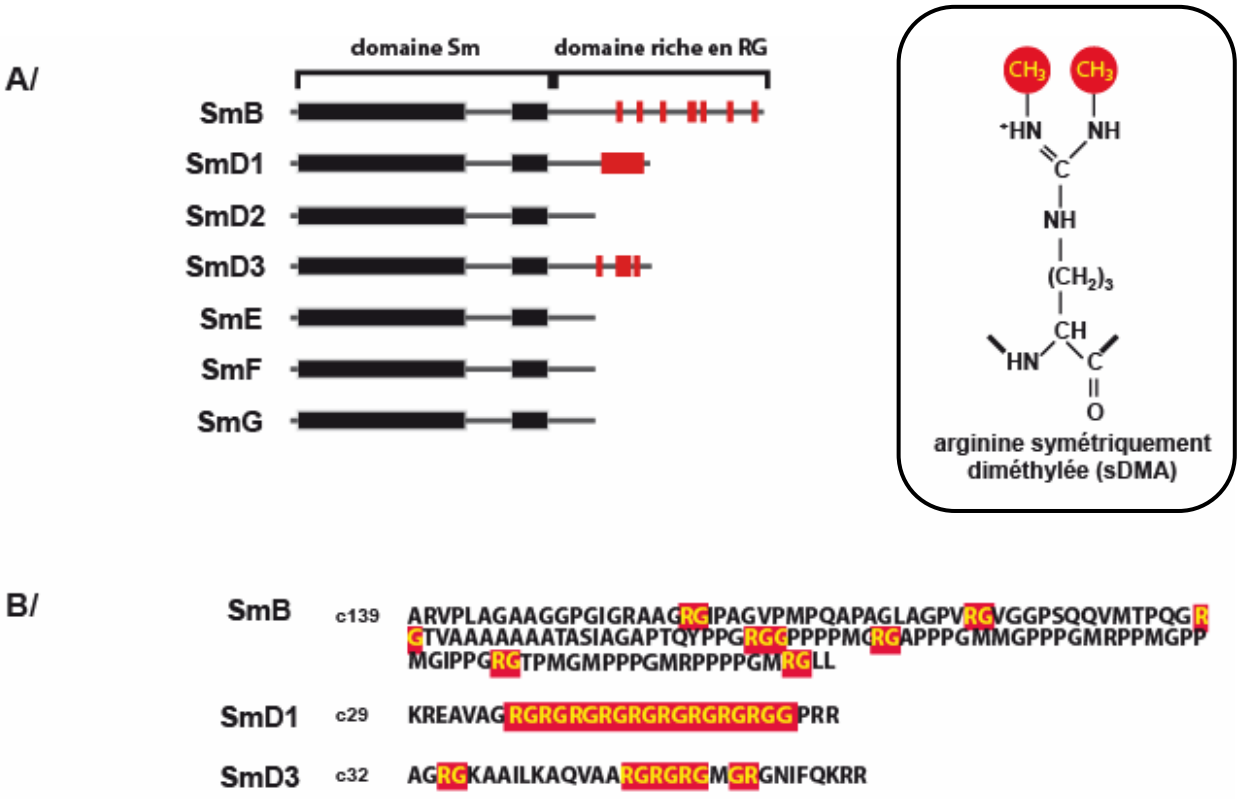


Figure 15 : Modifications post-traductionnelles des protéines Sm

A/ Alignement des protéines Sm. Les enchaînements arginines et glycines (RG) des protéines Sm B, D1 et D3 sont représentés par des rectangles rouges. Le domaine Sm commun à toutes les protéines Sm est représenté par des carrés noirs. **B/** Séquences des régions C-terminales des protéines Sm B, D1 et D3. Les enchaînements des arginines symétriquement diméthylées (encart à droite) sont encadrées en jaune sur fond rouge. D'après Friesen & Dreyfuss, 2000.

méthylosome, il est composé des protéines pICln, de la méthyltransférase IBP72 rebaptisée par la suite JBP1/PRMT5 et de MEP50 ***(Figure 16)*** (Meister et al, 2001a ; Meister et al, 2001b ; Friesen et al, 2001a ; Friesen et al, 2002). De plus, il est possible que la méthyltransférase PRMT7 joue un rôle dans la méthylation des protéines Sm (Gonsalvez et al, 2007).

L'interaction des protéines Gemin 6/7 avec les protéines Sm est le second type d'interaction particulièrement bien étudié. Alors que les séquences primaires des protéines Gemin 6 et 7 ne présentent aucune homologie significative avec d'autres protéines connues (Baccon et al, 2002 ; Pellizzoni et al, 2002b), des expériences de cristallographie de sous-complexes Gemin 6/7 ont, cependant, révélé que Gemin 6 comme Gemin 7 présentent des repliements similaires à ceux observés dans les protéines Sm ***(Figure 17 A/)*** (Ma et al, 2005). Ces résultats apportent d'importantes informations sur le mode de recrutement, possible, des protéines Sm sur le complexe SMN. En effet, on peut imaginer que les protéines Sm puissent interagir de chaque coté du dimère formé par le complexe Gemin 6/7 pour ensuite progressivement s'organiser en anneau, au sein du complexe SMN ***(Figure 17 B/)*** (Ma et al, 2005). Ainsi, les protéines Sm seraient d'abord recrutées grâce à leurs extrémités C-terminales méthylées, puis les domaines Sm des protéines Sm interagiraient avec le dimère formé par les protéines Gemin 6/7 qui les structureraient en vue de leur future association avec les UsnRNA et les autres protéines Sm (Leung & Nagai, 2005). L'absence de la protéine Gemin 8 dans un extrait cellulaire entraîne la dissociation des protéines Gemin 6/7/unrip du complexe SMN et affecte son association avec les protéines Sm (Carissimi et al, 2006b). Cette expérience montre donc l'importance cruciale des protéines Gemin 6/7 pour le recrutement des protéines Sm sur le complexe SMN.

- ***Les bases moléculaires de l'interaction entre le complexe SMN et les UsnRNA***

Des expériences d'injection de UsnRNA dans des oocytes de Xénope, suivies d'immunoprécipitation avec des anticorps anti-SMN, ont montré que le complexe SMN est associé avec les UsnRNA, *in vivo* (Yong et al, 2002). L'équipe de G. Dreyfuss a ensuite montré, *in vitro,* qu'un complexe SMN purifié dépourvu de protéines Sm avait la capacité d'interagir avec les snRNA U1, U2, U4 et U5 (Yong et al, 2004a). L'interaction entre les

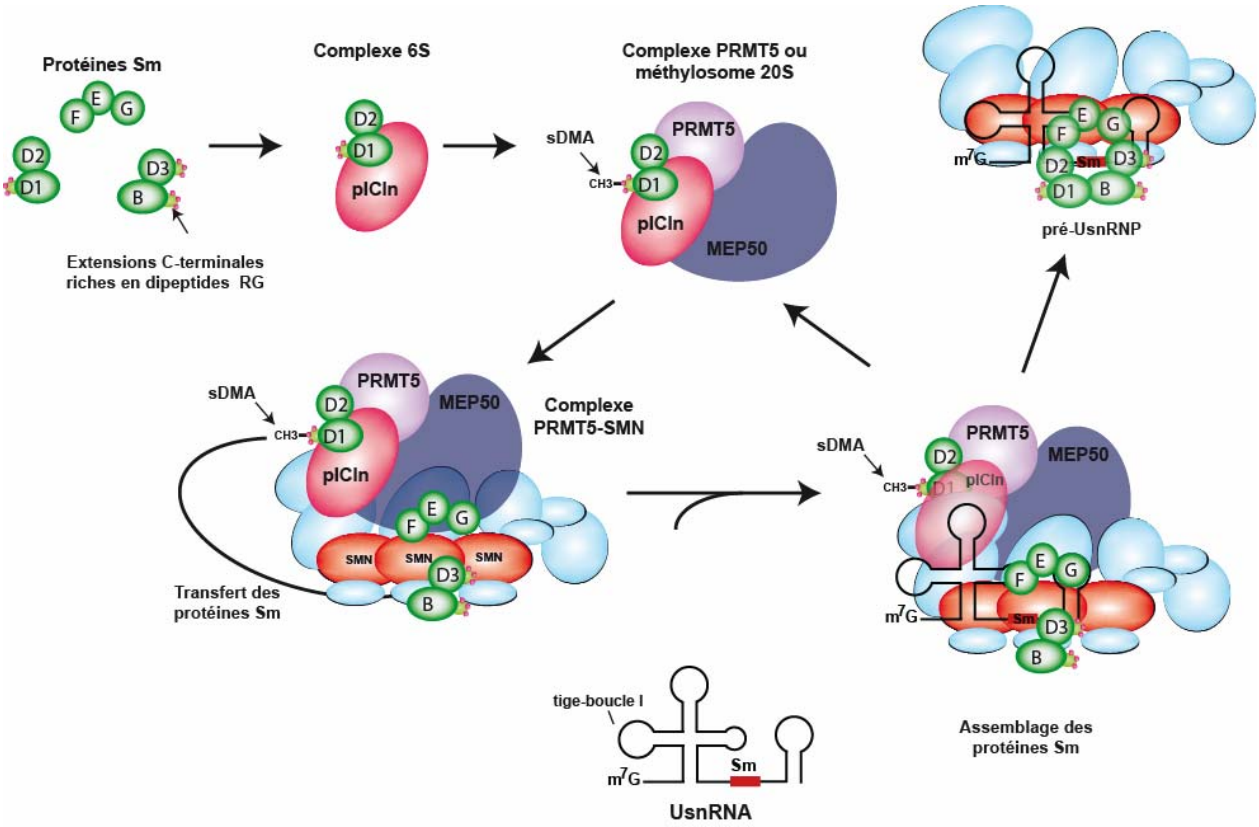


Figure 16 : Assemblage des protéines Sm par le complexe SMN-PRMT5

Les protéines Sm sont retrouvées dans le cytoplasme associées en pré-complexes Sm D1/D2, Sm B/D3 et Sm F/Sm E/Sm G. Le méthylosome les recrute par sa sous-unité pICln. La méthyltransférase PRMT5 diméthyle symétriquement les protéines Sm B, D1 et D3. Le méthylosome transfère ensuite l'ensemble des protéines Sm sur le complexe SMN. Ce n'est qu'une fois associé avec les 7 protéines Sm que le complexe SMN conduit l'assemblage des protéines Sm sur le site Sm des UsnRNA. Ce processus est facilité par le méthylosome. Une fois les protéines Sm associées, le méthylosome se dissocie de la particule. Adaptée de la revue, Meister et al, 2002.

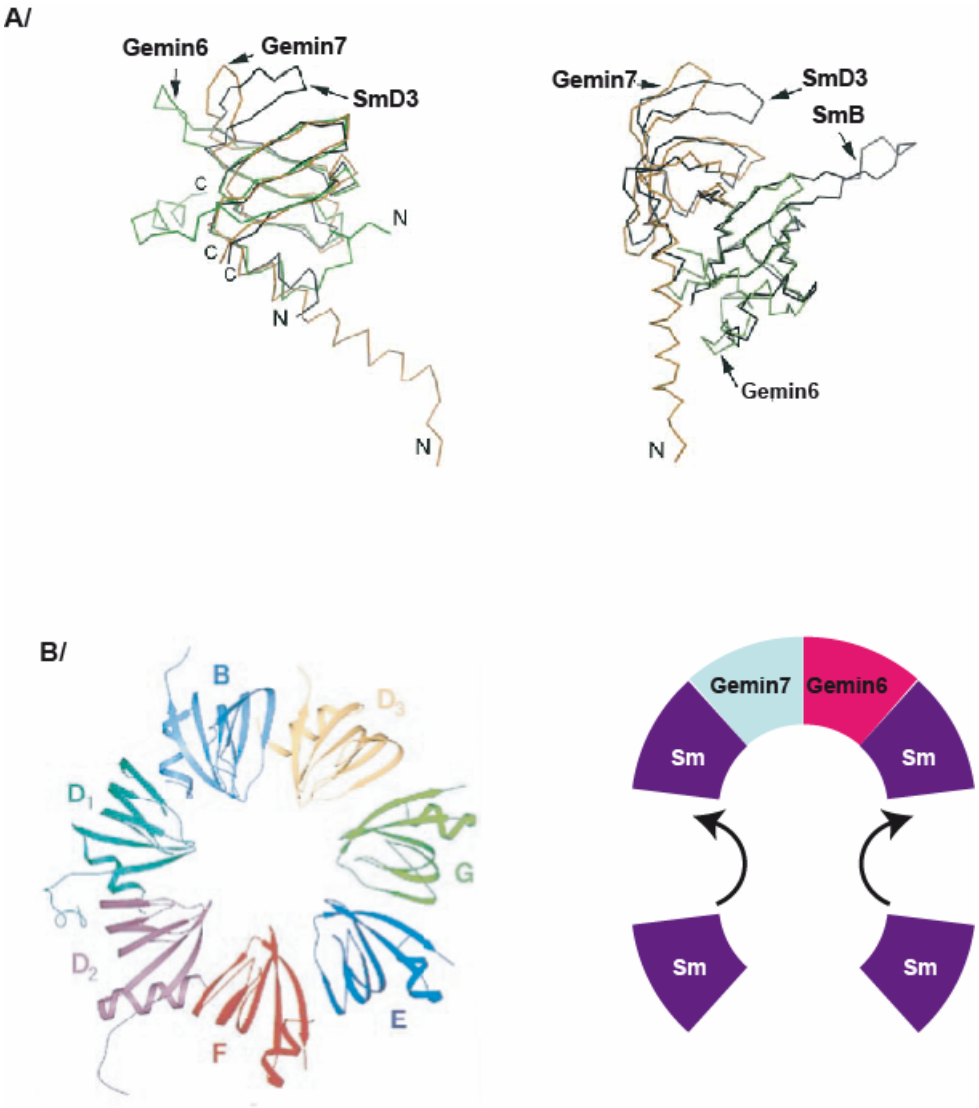


Figure 17 : Implication des protéines Gemin 6/7 dans le recrutement des protéines Sm au complexe SMN

A/ Superposition de la protéine Sm D3 (noir), de la protéine Gemin 6 (vert) et de la protéine Gemin 7 (orange) et superposition du complexe Gemin 6/7 (vert et orange) avec le complexe Sm B/D3. D'après, Ma et al, 2005. **B/** Les protéines Gemin 6 et Gemin 7 présentent des repliements similaires à ceux observés dans les protéines Sm (Ma et al, 2005). Au sein du complexe SMN, les protéines Sm viendraient interagir avec le dimère formé par les protéines Gemin 6/7 qui les structureraient en vue de leur future association avec les UsnRNA et les autres protéines Sm (Leung & Nagai, 2005).

UsnRNA et le complexe SMN est donc directe et ne se fait pas via des interactions entre les UsnRNA et les protéines Sm. De manière intéressante, en absence de complexe SMN, les protéines Sm purifiées sont capables de s'associer, *in vitro,* à d'autres cibles telles que les ARN ribosomaux 5S et 5,8S ainsi que les ARNt. En effet, ces protéines reconnaissent le site Sm (Branlant et al, 1982) ; qui est présent dans de nombreux ARN. Ces résultats montrent que les protéines Sm ont une faible spécificité au regard de leurs substrats (Pellizzoni et al, 2002b ; Pellizzoni et al, 2002a). Or, la spécificité de fixation des protéines Sm sur les UsnRNA a une importance cruciale. En effet, leur fixation sur d'autres ARN cellulaires aurait un effet néfaste pour les cellules. Dans ce contexte, le complexe SMN apparaît comme un facteur de spécificité permettant la sélection de l'ARN sur lequel doit s'assembler les protéines Sm en empêchant leur association illicite sur des ARN autres que les UsnRNA.

Des études ont été menées en vue de définir les domaines des UsnRNA nécessaires à leur interaction avec le complexe SMN, mais les données ne sont pas encore très claires. Ces domaines contiennent une (dans le cas des snRNA U1 et U5) ou deux (dans le cas des snRNA U2 et U4) structures tige-boucle ***(en violet sur la Figure 18)*** (Yong et al, 2004a; Yong et al, 2002). La substitution de trois nucléotides dans la tige-boucle 1 du snRNA U1 (SL1A3) inhibe son interaction avec le complexe SMN (Yong et al, 2002). L'utilisation de UsnRNA mutés a montré que les sites Sm des snRNA U4 et U5 sont nécessaires à l'interaction avec le complexe SMN purifié, contrairement aux sites Sm des snRNA U1 et U2. Le fait que le complexe SMN interagisse avec tous les UsnRNA, excepté le snRNA U6, suggère l'existence possible de caractéristiques communes entre ces ARN. Cependant, les domaines, reconnus par le complexe SMN, ne montrent pas de similitudes marquées, ni au niveau séquence primaire, ni au niveau structure secondaire. Sur la base d'expériences de compétition entre UsnRNA pour la fixation au complexe SMN, il apparaît que le snRNA U1 entre en compétition avec les snRNA U2 et U5 mais pas avec le snRNA U4 (Yong et al, 2004a). De même, le snRNA U4 entre en compétition avec les snRNA U2 et U5 et à un plus faible degré avec le snRNA U1. Le snRNA U2 entre en compétition avec les snRNA U1 et U4 mais seulement à haute concentration. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'au moins deux sites différents de haute affinité pour la fixation des UsnRNA au complexe SMN, un

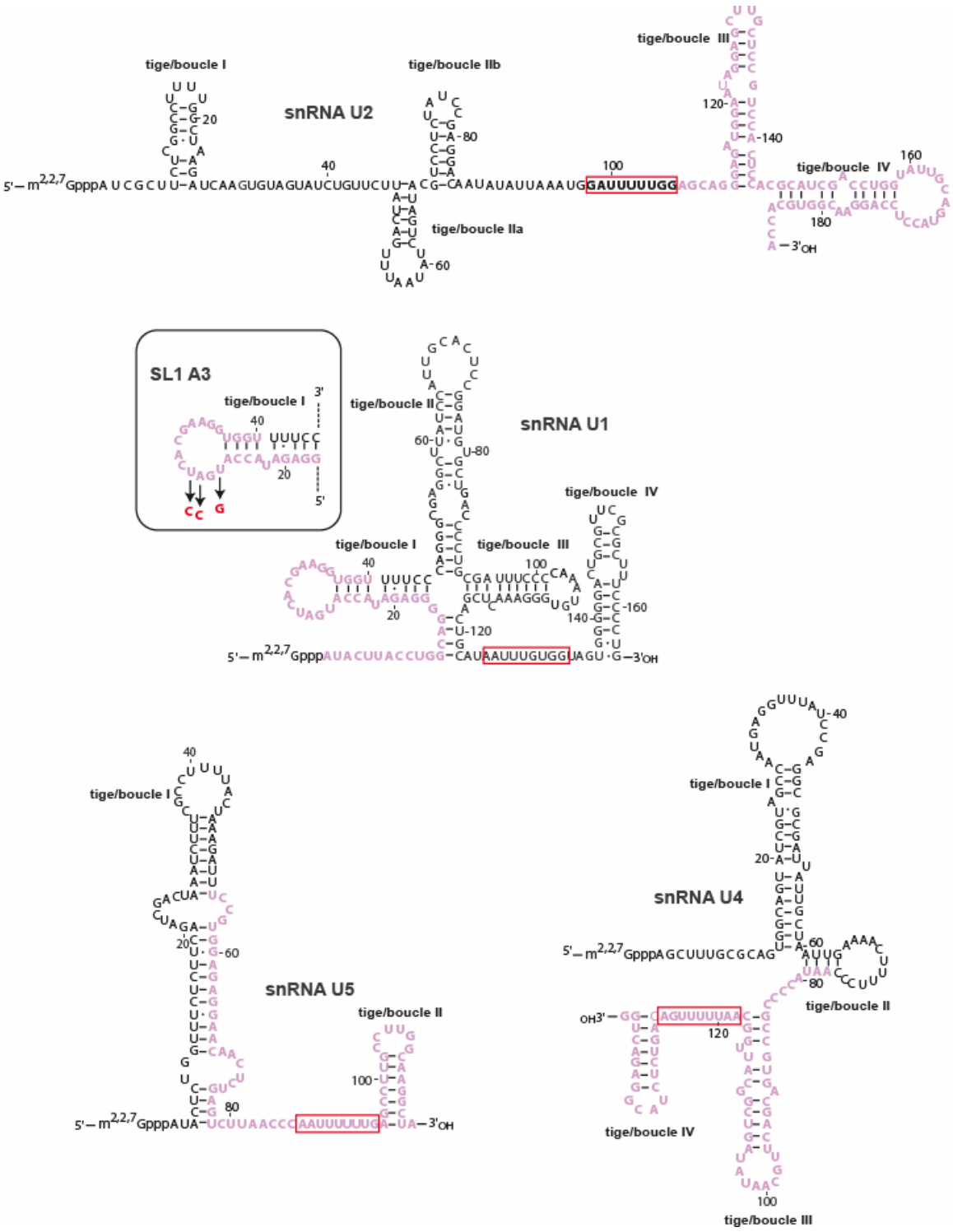


Figure 18 : Régions des snRNA spliceosomaux U1, U2, U4 et U5 nécessaires à leur interaction avec le complexe SMN

La séquence permettant la fixation des protéines Sm est encadrée en rouge dans les différents UsnRNA (Branlant et al, 1982). Les nucléotides violets, représentent les régions de chaque UsnRNA suffisantes pour qu'il y ait une interaction avec le complexe SMN (Yong et al, 2004a ; Yong et al, 2002). Le mutant SL1A3, dans l'encart à gauche, correspond au snRNA U1 muté dans sa tige-boucle 1 qui ne fixe plus le complexe SMN.

pour le snRNA U1 et un autre pour le snRNA U4 et probablement des sites de plus faible affinité pour les autres (Yong et al, 2004a). En utilisant des mini-substrats ARN, l'équipe de G. Dreyfuss a défini certaines caractéristiques nécessaires à l'association des ARN avec le complexe SMN. En effet, le complexe SMN s'associe, *in vitro*, avec des mini-substrats dérivés des UsnRNA contenant un site Sm (AUUUUG) et une tige boucle 3' terminale ***(Figure 19)*** (Golembe et al, 2005b). Alors que la séquence de la tige-boucle n'a pas d'impact sur la liaison avec le complexe SMN, l'adénosine et les résidus uridine en première et troisième position du site Sm semblent critiques (Golembe et al, 2005b). Ce modèle de reconnaissance ***(Figure 19)*** est valable pour les snRNA U4 et U5, mais pas pour le snRNA U1 qui est reconnu par le complexe SMN par l'intermédiaire de sa tige-boucle en 5' et ceci indépendamment de son site Sm (Yong et al, 2004a ; Yong et al, 2002).

L'équipe de G. Dreyfuss a proposé que la protéine Gemin 5 soit la protéine du complexe SMN capable de fixer spécifiquement les UsnRNA. En effet, la protéine Gemin 5 interagit, *in vitro*, directement avec tous les UsnRNA (Battle et al, 2006). De plus, un complexe SMN déficient en protéine Gemin 5 n'est plus capable de faciliter l'assemblage des snRNP U1 et U4 (Feng et al, 2005 ; Battle et al, 2006 ; Otter et al, 2007). Cependant, comme plusieurs modes de reconnaissance semblent exister au sein du complexe SMN, la protéine Gemin 5 pourrait ne pas être le seul facteur de spécificité assurant la fixation des UsnRNA au sein du complexe SMN.

- ***Cycle d'assemblage des UsnRNP médié par le complexe SMN***

La ***figure 20*** présente un modèle d'assemblage des UsnRNP reposant sur les données obtenues par plusieurs équipes (pour revues, Paushkin et al, 2002 ; Meister et al, 2002 ; Yong et al, 2004b ; Gubitz et al, 2004 ; Pellizzoni, 2007 ; Neuenkirchen et al, 2008). Dans le cytoplasme, les protéines Sm doivent interagir avec le complexe SMN avant d'être assemblées sur les UsnRNA. Ces protéines, synthéthisées dans le cytoplasme, sont initialement séquestrées par le méthylosome. La protéine pICln joue certainement un rôle important dans la formation de ce complexe puisqu'elle interagit à la fois avec les protéines Sm et JBP1 (Pu et al, 1999 ; Friesen et al, 2001a ; Meister et al, 2001b). Une fois recrutées par le méthylosome, les résidus arginines des protéines Sm B, D1 et D3 sont

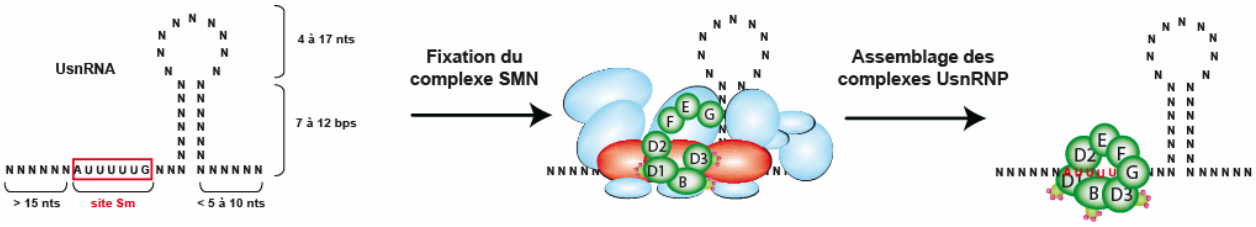


Figure 19 : Caractéristiques des séquences d'ARN minimales permettant la fixation au complexe SMN et l'association aux protéines Sm

A l'exception du snRNA U1, chacune des molécules de UsnRNA possède une région minimale de fixation au complexe SMN, constituée du site Sm et d'au moins une des structures en tige-boucle en aval du site Sm, indépendamment de sa séquence. De plus, la reconnaissance par le complexe SMN exige une structure en tige-boucle de 7 à 12 pb ainsi qu'une distance entre le site Sm et l'extrémité 3' du UsnRNA de moins de 10 nt (Yong et al, 2004a ; Yong et al, 2002 ; Golembe et al, 2005a; Golembe et al, 2005b).

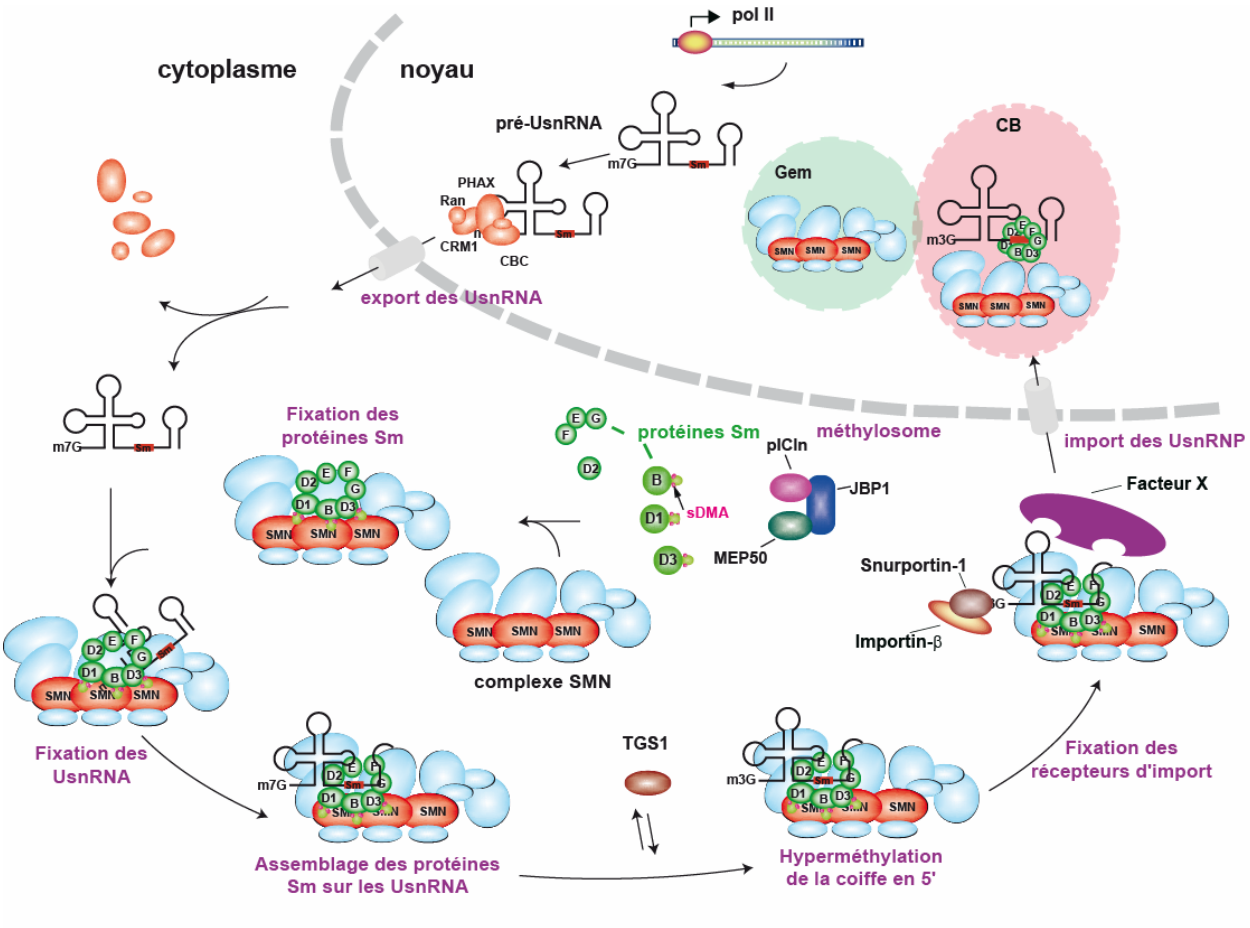


Figure 20 : Implication du complexe SMN dans la biogenèse des UsnRNP spliceosomales

Voir la partie texte concernant le *Cycle d'assemblage des UsnRNP médié par le complexe SMN.* Adapté de la revue Pellizzoni, 2007.

symétriquement méthylés. La méthylation des protéines Sm est une étape indispensable à l'assemblage des pré-UsnRNP (Cote & Richard, 2005 ; Gonsalvez et al, 2007). Il est possible que la formation des pré-complexes Sm D1/D2, Sm B/D3 et Sm F/Sm E/Sm G ait lieu au sein même du méthylosome (pour revue, Neuenkirchen et al, 2008). Pour pouvoir ensuite être assemblée sur les UsnRNA, l'intégralité des protéines Sm doit être chargée sur le complexe SMN qui facilite, ensuite, l'assemblage des protéines Sm sur le site Sm des UsnRNA. Une fois les protéines Sm associées, le méthylosome se dissocie de la particule ***(figure 16)*** (pour revue, Meister et al, 2002).

Il est intéressant de remarquer que la protéine Gemin 5 réside, en majorité, sous forme libre dans le cytoplasme et est capable de fixer, *in vitro,* les UsnRNA en dehors du complexe SMN (Battle et al, 2007). Une hypothèse serait alors que, dans le cytoplasme, Gemin 5 recruterait les UsnRNA en dehors du complexe SMN et les délivrerait de manière ATP-dépendante au reste du complexe SMN. Cependant, il est également possible que la protéine Gemin 5 fixe les UsnRNA libres et les séquestre en attendant leur assemblage en UsnRNP par le complexe SMN (Battle et al, 2007).

La protéine SMN est une phosphoprotéine (Sanchez-Olea et al, 1998 ; La Bella et al, 2004 ; Grimmler et al, 2005). La phosphorylation de la protéine SMN joue un rôle majeur dans la régulation de son activité. En effet, la phosphorylation de la protéine SMN au niveau des résidus sérine en position 28 et 31, à la jonction entre les segment codés par les exon 1 et 2a, est dépendante de sa localisation cellulaire. La protéine SMN est sous forme phosphorylée dans le cytoplasme et, dans ce cas, le complexe SMN est actif dans l'assemblage des protéines Sm alors que la protéine SMN est déphosphorylée dans le noyau (Grimmler et al, 2005 ; Petri et al, 2007).

1.2.2/ Le complexe SMN pourrait jouer le rôle de chaperon dans la biogenèse des UsnRNP

En plus du rôle qu'il joue dans l'assemblage des protéines Sm, le complexe SMN est associé aux UsnRNA tout au long de la biogenèse des UsnRNP. En effet, il interagit avec les UsnRNA, dès leur entrée dans le cytoplasme, et reste associé aux pré-UsnRNP,

jusqu'à leur retour dans le noyau (Massenet et al, 2002 ; Narayanan et al, 2002). Le complexe SMN pourrait donc jouer un rôle de chaperon dans la biogenèse des pré-UsnRNP, coordonnant l'assemblage des pré-UsnRNP avec les autres étapes de ce processus et contrôlerait la qualité de l'assemblage. Ainsi, l'équipe de R. Bordonné a montré *in vitro* et *in vivo* l'existence d'une interaction entre la méthylase responsable de l'hyperméthylation de la structure coiffe des UsnRNA (TGS1) et la protéine SMN (Mouaikel et al, 2003b). Cette interaction suggère la participation du complexe SMN dans le processus d'hyperméthylation de la structure coiffe et/ou dans le recrutement de la méthylase (Mouaikel et al, 2003b). Enfin, l'import du complexe SMN et celui des UsnRNP dans le noyau seraient couplés (Narayanan et al, 2004). En effet, l'import du complexe SMN dans le noyau serait dépendant des pré-UsnRNP et réciproquement. Les UsnRNP et le complexe SMN s'accumulent, tous les deux, dans les CB. Un assemblage actif des UsnRNP et donc la présence de la protéine SMN dans les cellules sont nécessaires à la formation des CB (Shpargel & Matera, 2005 ; Girard et al, 2006 ; Lemm et al, 2006), corpuscules qui jouent un rôle important dans la biogenèse et la modification des RNP cellulaires (pour revues, Gall, 2001 ; Matera & Shpargel, 2006). Les CB sont caractérisés par la présence de la coiline. Cette protéine en interagissant à la fois avec les protéines Sm et SMN pourrait permettre le recrutement des UsnRNP et du complexe SMN dans les CB (Hebert et al, 2002 ; Hebert et al, 2001 ; Xu et al, 2005a). L'interaction entre la coiline et la protéine SMN est dépendante de la région de la coiline riche en enchaînements RG portant des méthylations symétriques (sDMA) (Hebert et al, 2002 ; Hebert et al, 2001). ZPR1 est une autre protéine qui semble importante pour la localisation nucléaire du complexe SMN (Gangwani et al, 2005 ; Gangwani et al, 2001). Cette protéine serait associée de manière indirecte à la protéine SMN *in vivo*. De plus, l'absence de cette protéine entraîne des défauts dans les axones et une neurodégénerescence conduisant à la mort cellulaire (Gangwani et al, 2005 ; Doran et al, 2006). A noter que la phosphatase Tim50a, une autre protéine qui interagit directement avec la protéine SMN, la coiline et les UsnRNP ***(Tableau IV, pages 36 et 37)***, est localisée dans les speckles. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans le relarguage des UsnRNP et du complexe SMN des CB (Xu et al, 2005a).

2/ Rôle du complexe SMN dans l'assemblage de particules ribonucléoprotéiques autres que les UsnRNP

2.1/ Implication du complexe SMN dans l'assemblage d'autres RNP contenant les protéines Sm et Lsm

2.1.1/ Les UsnRNP mineures

Les UsnRNP spliceosomales sont divisées en deux classes distinctes suivant le type d'introns (Patel & Steitz, 2003). La grande majorité des introns eucaryotes sont épissés par les spliceosomes dits « majeurs » contenant les snRNP U1, U2, U4/U6 et U5 (cf. chapitre II paragraphe *1.1.1/ La réaction d'épissage*). Moins de 1% des introns sont épissés par les spliceosomes dits « mineurs » contenant les snRNP U11, U12, U4atac/U6atac et U5. La séquence 5' des introns mineurs fixant U11 est différente de celle des introns majeurs qui fixent U1, ce qui détermine l'engagement soit dans la voie majeure soit dans la voie mineure d'épissage des ARN pré-messagers (Patel & Steitz, 2003 ; Wu & Krainer, 1999). Des analyses bioinformatiques des séquences introniques à partir de bases de données révèlent la présence d'approximativement 700 introns mineurs dans le génome humain (Levine & Durbin, 2001 ; Sheth et al, 2006 ; Alioto, 2007). En accord avec la relativement faible abondance de ces introns, les UsnRNA mineurs (10^3 – 10^4 par cellules) sont moins abondants que les UsnRNA majeurs (10^5 – 10^6 par cellules). Le snRNA U11 interagit avec le complexe SMN purifié (Yong et al, 2004a) et l'assemblage des protéines Sm sur les UsnRNA mineurs, comme celle des UsnRNA majeurs, semblent dépendre du complexe SMN (Pellizzoni et al, 2002b).

2.1.2/ Les HSUR

Le virus HSV (*Herpesvirus saimir)* code pour 7 petits ARN de 75 à 143 nucléotides, appelés HSUR 1 à 7 (HSUR 6 et 7 : Albrecht & Fleckenstein, 1992 ; HSUR 1 à 4 : Murthy et al, 1986 ; Lee et al, 1988 ; Lee & Steitz, 1990 ; HSUR 5 : Wassarman et al, 1989). Les HSUR sont fortement exprimés par les virus (Murthy et al, 1986), toutefois leurs fonctions restent inconnues (Murthy et al, 1986 ; Ensser et al, 1999). Les HSUR contiennent un site Sm canonique (AUUUUUG) et leurs structures secondaires sont proches de celles des UsnRNP d'après des prédictions basées sur leur séquence (Albrecht & Fleckenstein, 1992 ;

Lee et al, 1988 ; Lee & Steitz, 1990 ; Wassarman et al, 1989). Comme les UsnRNA, les HSUR sont transcrits par l'ARN polymérase II, acquièrent une coiffe triméthylée et s'associent avec les protéines Sm (Lee et al, 1988). Le complexe SMN interagit avec les HSUR et permet leur association aux protéines Sm (Golembe et al, 2005a). Les régions des HSUR nécessaires à leur fixation au complexe SMN incluent le site Sm et la tige boucle 3' terminale (Golembe et al, 2005b). Il a également été montré que les HSUR 1, 3 et 4 entrent en compétition avec le snRNA U4, mais pas avec le snRNA U1 pour la fixation au complexe SMN (Golembe et al, 2005a).

2.1.3/ La particule U6

Le snRNA U6 contient une courte séquence riche en résidus uridines à son extrémité 3' (Rinke et al, 1985 ; Kunkel et al, 1986) où viennent se fixer les 7 protéines Lsm (Lsm2-8) (Achsel et al, 1999). De manière intéressante, la protéine SMN interagit avec au moins deux des 7 protéines Lsm qui s'associent au snRNA U6 : Lsm 4 et Lsm 6 (Friesen & Dreyfuss, 2000). Le domaine C-terminal riche en arginines et glycines de Lsm 4 porte des diméthylations symmétriques nécessaires à sa fixation au domaine Tudor de la protéine SMN (Brahms et al, 2001). Ces résultats suggèrent que le complexe SMN pourrait avoir un rôle dans l'assemblage et/ou la régénération de la snRNP U6 (Friesen & Dreyfuss, 2000). De plus, comme les protéines Lsm 1-7 interviennent dans les processus de dégradation des ARN (pour revue, Beggs, 2005), le complexe SMN pourrait donc également intervenir dans ces mécanismes.

2.1.4/ La particule U7

La snRNP U7 est une RNP essentielle à la maturation des extrémités 3' des transcrits des gènes d'histones qui ne sont pas polyadénylés (pour revue, Muller & Schumperli, 1997). Un clivage en 3' est produit après l'appariement avec la particule U7. La particule U7 diffère également des snRNP classiques dans sa composition. Elle contient 5 des 7 protéines Sm entrant dans la composition de toutes les autres UsnRNP. Ce sont les protéines Sm B, D3, E, F, G, ainsi que deux protéines Lsm spécifiques à U7, les protéines Lsm 10 et Lsm 11 qui remplacent les protéines Sm D1 et D2 ***(Figure 21)*** (Pillai et al, 2001 ; Pillai et al, 2003). Le snRNA U7 comporte environ 57 nucléotides chez les vertébrés. Il présente à son

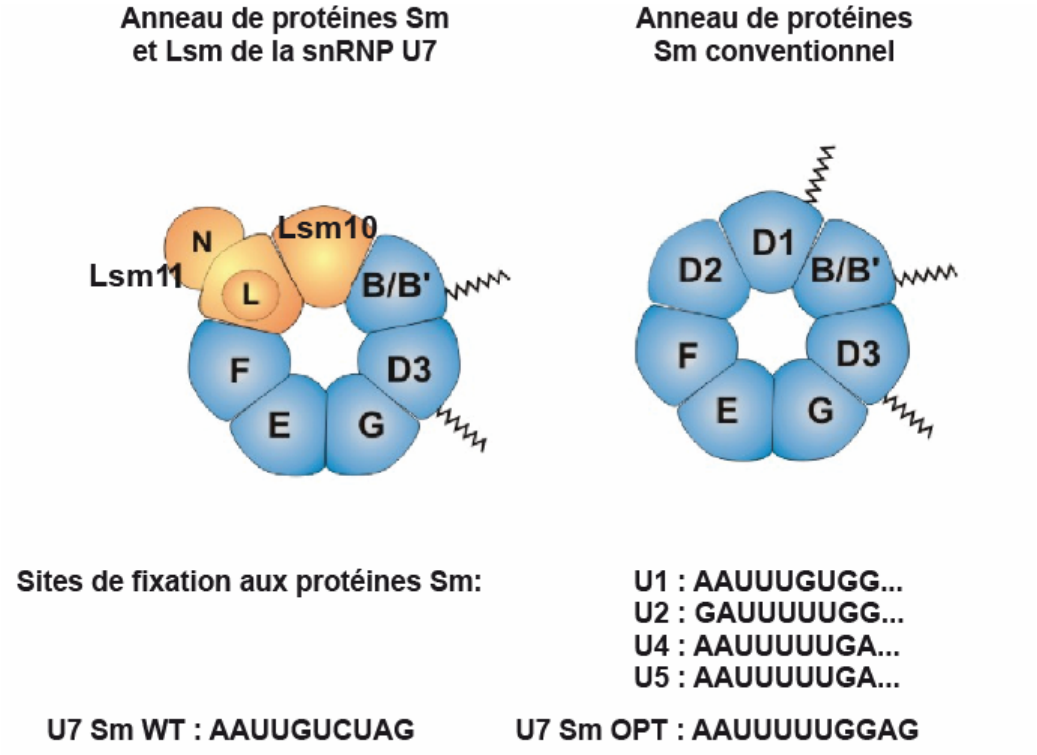


Figure 21 : Modèle schématique représentant l'architecture du complexe Sm/Lsm de la snRNP U7

La composition de la snRNP U7 diffère de celle des snRNP classiques. Alors que ces dernières contiennent un noyau de sept protéines Sm classiques à savoir B/B', D1, D2, D3, E, F et G (à droite), la snRNP U7 (à gauche) possède deux protéines spécifiques de type Sm-like, Lsm 10 et Lsm 11 qui remplacent les protéines Sm D1 et D2. Lsm 11 possède une extension N-terminale (N) et une longue séquence linker (L) entre ses deux motifs Sm impliqués dans l'assemblage au snRNA U7. La conversion du motif de fixation aux protéines Sm spécifique au snRNA U7 (U7 Sm WT) en motif consensus (U7 Sm OPT) dérivé des motifs de fixation aux protéines Sm de U1, U2, U4 et U5 entraîne l'assemblage en une particule classique contenant les protéines D1 et D2. L'assemblage de la particule U7 est donc déterminé par la séquence de son site de fixation aux protéines Sm et est médié par des complexes SMN distincts contenant soit le dimère D1/D2, soit le dimère Lsm 10/Lsm 11. Les extensions représentées sur les protéines B/B', D1 et D3 correspondent à des répétitions du dipeptide Arginine-Glycine qui contiennent des modifications de type diméthyl-arginines symétriques introduites par le complexe méthyl-transférase PRMT5. Adapté de Pillai et al, 2003; Pillai et al, 2001.

extrémité 5' une coiffe tri-méthylée et une séquence s'appariant à l'extrémité 3' des ARN pré-messagers d'histones. Son site de fixation aux protéines Sm est non canonique et il est directement impliqué dans l'assemblage de la particule. Enfin, cet ARN possède au niveau de son extrémité 3' une longue structure en tige-boucle probablement requise pour sa stabilité (Schumperli & Pillai, 2004). L'assemblage de la snRNP U7 ressemble à celui des UsnRNP classiques mais nécessite la présence d'un complexe SMN spécifique associé aux protéines Sm B/B', D3, E, F, G et aux protéines Lsm 10 et 11 (Pillai et al, 2003 ; Azzouz et al, 2005a). Avant d'être incorporées au complexe SMN, les protéines Sm B/B', D1 et D3 sont méthylées (Schumperli & Pillai, 2004). Les protéines Lsm 10 et Lsm 11 interagissent quant à elles avec le complexe SMN en l'absence de diméthyl-arginine symétrique. Il existerait, donc, au sein du complexe SMN, deux sites de fixation distincts pour les protéines Sm/Lsm (Azzouz et al, 2005b). *In vitro*, le complexe SMN purifié n'interagit pas avec le snRNA U7 (Battle et al, 2007). Cependant, il est possible qu'une interaction ait lieu *in vivo* ou que le complexe SMN permette l'assemblage de la particule U7 sans interagir de manière directe avec l'ARN.

2.2/ Rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage des snoRNP

Dans les cellules eucaryotes, les snoRNP se répartissent en deux classes selon les petits ARN non codants (snoRNA : *small nucleolar RNA*) qui les composent ***(Figure 22)***. Ils contiennent également des protéines spécifiques dont certaines interagissent avec la protéine SMN (Jones et al, 2001 ; Pellizzoni et al, 2001a ; Whitehead et al, 2002).

2.2.1/ Les complexes snoRNP

Les snoRNA sont des petits ARN non codant, longs de 60 à 300 nucléotides. Ces petits ARN sont localisés dans le nucléole et interviennent dans la biogenèse des ribosomes et plus particulièrement dans les clivages et les modifications post-transcriptionnelles des ARN pré-ribosomiques (pour revue, Terns & Terns, 2002). Les snoRNA sont divisés en deux familles selon leurs séquences et leurs caractéristiques structurales : les snoRNA à boîtes H/ACA et à boîtes C/D (pour revues, Tollervey & Kiss, 1997 ; Kiss, 2006).

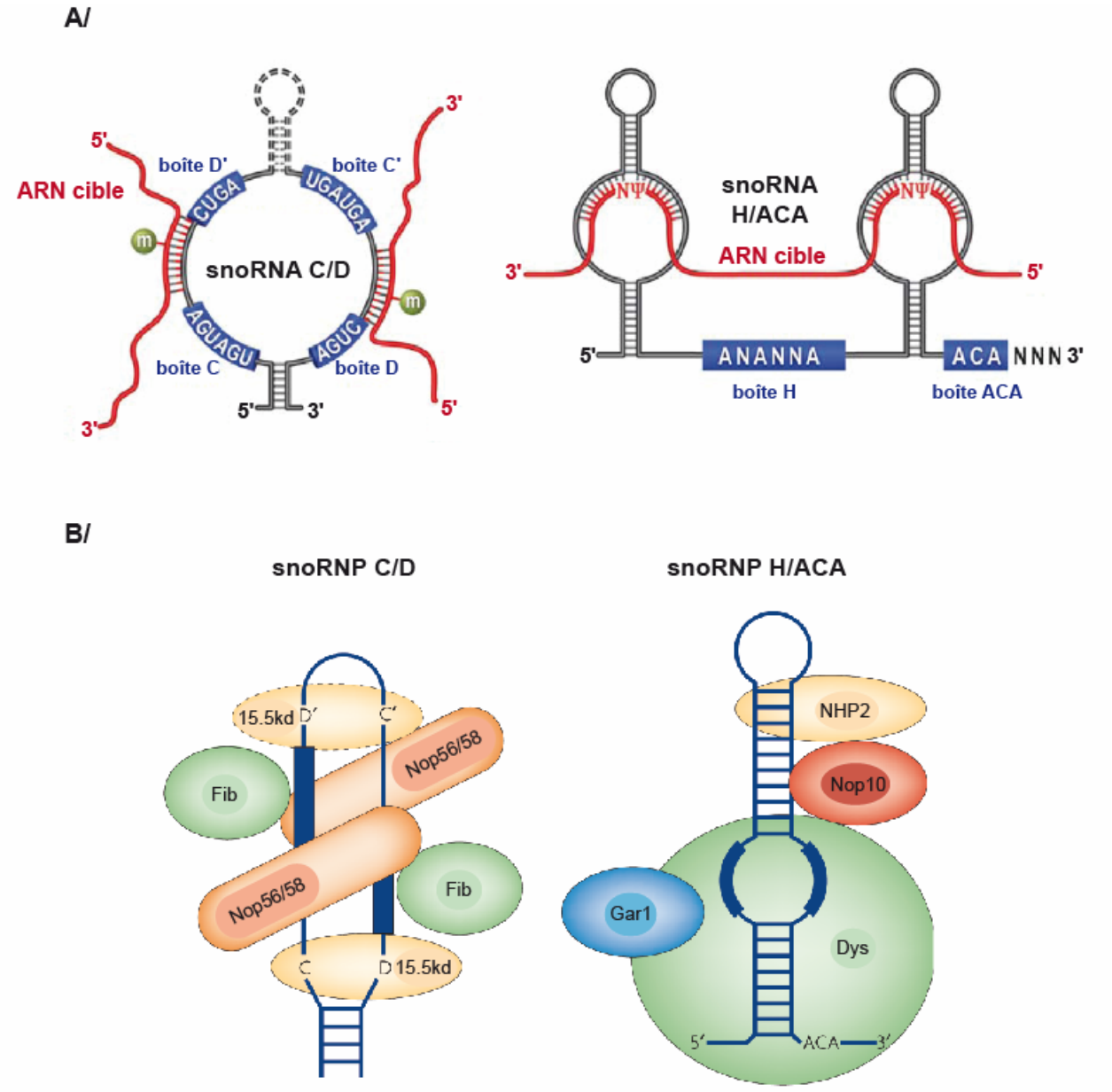


Figure 22 : Composition et organisation des complexes snoRNP

A/ Structure des snoRNA à boîtes C/D et H/ACA. L'ARN cible est indiqué en rouge et les boîtes conservées des snoRNA en bleu. Les snoRNA à boîtes C/D guident la réaction de 2'-O-méthylation qui nécessite un appariement de bases de 10 à 20 nt en amont des boîtes D et D' avec l'ARN cible. Le 5ème nucléotide apparié en amont des boîtes D et D' est sélectionné pour être méthylé. Les snoRNA à boîtes H/ACA guident l'isomérisation de résidus U (uridine) en résidus ψ (pseudouridine) au sein des ARN cibles venant s'apparier au niveau de boucles internes appelées poches de pseudouridylation. Le site de pseudouridylation se situe 14 à 16 nt en amont des motifs H et ACA. D'après la revue, Cao et al, 2006. **B/** Modèle d'assemblage des protéines des snoRNP C/D et des protéines des snoRNP H/ACA. Fib : Fibrillarine (2'-O-methyltransférase), Dys : Dyskérine. Adapté de la revue, Matera et al, 2007.

La majorité des snoRNA à boîtes H/ACA sont caractérisés par la présence de deux structures en tige-boucle séparées par une séquence en simple brin contenant la boîte H, la seconde structure tige-boucle est suivie d'une séquence simple brin terminale contenant la boîte ACA (Balakin et al, 1996 ; Ganot et al, 1997a ; Ganot et al, 1997b) ***(Figure 22)***. La plupart des snoRNA à boîtes H/ACA guide l'isomérisation de résidus U (uridine) en résidus ψ (pseudouridine) au sein des ARN. Une ou les deux structures en tige-boucle contiennent des boucles internes appelées poches de pseudouridylation où s'apparie l'ARN cible. Chez les eucaryotes, les snoRNA à boîtes H/ACA sont associés à un ensemble de quatre protéines spécifiques : Cbf5 *(centromere binding factor 5)* (levure) ou dyskérine (homme), Gar1, Nop10 et Nhp2, pour former les complexes snoRNP H/ACA (pour revues, Terns & Terns, 2002 ; Matera et al, 2007). La protéine dyskérine porte l'activité de pseudouridylation et la protéine Gar1 est essentielle à cette activité (pour revue, Terns & Terns, 2002 ; Bachellerie et al, 2002).

Les snoRNA à boîtes C/D sont caractérisés par la présence d'un couple de boîtes conservées, les boîtes C (RUGAUGA) et D (CUGA) (Baserga et al, 1991 ; Huang et al, 1992 ; Caffarelli et al, 1996 ; Watkins et al, 1996) avec parfois un second groupe de boîtes similaires appelées C' et D' ***(Figure 22)***. Les snoRNA à boîtes C/D matures sont également associées à 4 protéines : Nop1/Fibrillarine, Nop56, Nop58 et une protéine de 15.5 kD (homme) ou Snu13p (levure) (Watkins et al, 2000), pour former les complexes snoRNP C/D (pour revues, Terns & Terns, 2002 ; Matera et al, 2007). A l'exception du snoRNA U3 qui intervient dans les clivages du précurseur des ARN ribosomiques, les snoRNP à boîtes C/D catalysent des réactions de 2'-O-méthylation des ARN ribosomiques. La protéine Nop1/Fibrillarine porte l'activité de 2'-O-méthylation (Tycowski et al, 1998 et pour revue, Terns & Terns, 2002).

2.2.2/ Biogenèse des snoRNP chez les eucaryotes

Les snoRNP sont, dans un premier temps assemblées sous forme de pré-complexes inactifs, lors de la transcription des snoRNA. Elles migrent dans les CB où elles sont maturées pour former des complexes actifs qui sont alors dirigées vers le nucléole. Les études récentes montrent que l'assemblage et le transport des snoRNP sont des mécanimes

régulés impliquant de nombreux facteurs dont certains sont aujourd'hui connus (McKeegan et al, 2007 ; Boulon et al, 2008 et pour revue, Matera et al, 2007).

- ***Assemblage co-transcriptionnel des complexes précurseurs (Figure 23)***

Quand un snoRNA à boîtes H/ACA est transcrit, trois des quatre protéines des snoRNP H/ACA (Cbf5, Nop10 et NHP2) et un facteur d'assemblage, appelé Naf1 (*Nuclear factor-1*), s'associe à l'ARN (Darzacq et al, 2006 ; Ballarino et al, 2005 ; Yang et al, 2005 ; Richard et al, 2006). La protéine Naf1 interagit avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II, incluant l'extrémité C-terminale (CTD) de la grande sous-unité de la polymérase. Cette interaction indique l'existence raisonnable d'un couplage entre l'assemblage de la snoRNP et la transcription du snoRNA (Yang et al, 2005 ; Fatica et al, 2002). La fixation de Naf1 assurerait l'assemblage d'un pré-snoRNP H/ACA stable mais sous une forme inactive, jusqu'à son remplacement par la protéine Gar1. Dans le noyau, l'échange entre les protéines Gar1 et Naf1 pourrait être une étape clé dans la transition entre le pré-complexe RNP H/ACA inactif et la snoRNP H/ACA active.

En ce qui concerne l'assemblage des snoRNP C/D, notre laboratoire, en collaboration avec d'autres équipes, a montré que la protéine 15.5 kD est la première protéine à se fixer au snoRNA (Watkins et al, 2000 ; Marmier-Gourrier et al, 2003). Son association initie l'assemblage des protéines Nop58, Fibrillarine et finalement Nop56. L'assemblage des complexes snoRNP à boîtes C/D semble également couplé à la transcription du snoRNA (Hirose & Steitz, 2001 ; Verheggen et al, 2002 ; Morlando et al, 2004) et à l'épissage des pré-ARNm (Hirose et al, 2003). Un facteur général d'épissage, appelé IBP60, semble faire le lien moléculaire entre ces deux mécanismes. Ce facteur s'associerait en amont des snoRNA introniques et aurait une activité hélicase putative qui déclencherait probablement l'assemblage des snoRNP C/D (Hirose et al, 2006). Cet assemblage fait intervenir un grand nombre de protéines non retrouvées dans les snoRNP, dont la protéine NUFIP. La protéine NUFIP pourrait jouer un rôle central dans ce processus. Elle interagit avec les 4 protéines des snoRNP (Fibrillarine, Nop58, Nop56 et 15.5kD) et avec la protéine Nhp2. Avec l'équipe E. Bertrand, notre laboratoire a également mis en évidence l'interaction de NUFIP avec d'autres protéines : TRIP3, hsp70, hsp90 et le complexe R2TP composé des protéines TIP49a et TIP49b

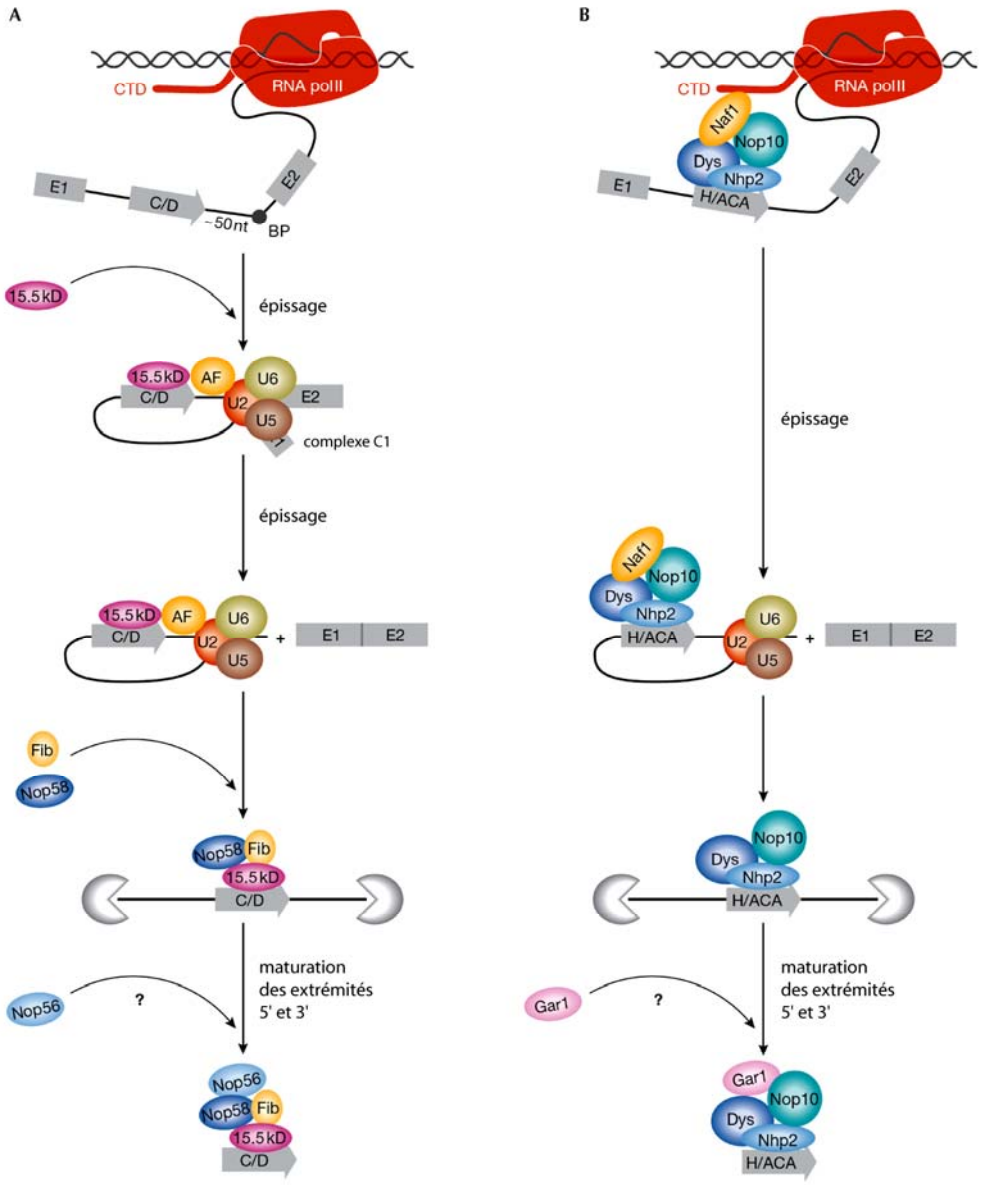


Figure 23 : Assemblage des snoRNP

A/ Assemblage dépendant de l'épissage des snoRNP C/D. Lorsque le complexe d'épissage C1 est formé, la protéine cœur centrale : 15.5 kD est recrutée sur le snoRNA. Fibrillarine (Fib) et la protéine nucléolaire Nop58 peuvent alors venir se fixer au snoRNA. Finalement, la protéine Nop56 viendrait s'y associer dans une dernière étape. **B/** Assemblage co-transcriptionnel des snoRNP H/ACA. Au cours de la transcription, la dyskérine (Dys), les protéines Nop10, Nhp2 et le facteur d'assemblage Naf1 (*Nuclear assembly factor*) viennent s'associer au snoRNA H/ACA. La protéine Naf1 est capable de s'associer à des composants de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II, y compris l'extrémité C-terminale (CTD) et participerait à la formation de pré-complexes RNP H/ACA stables, jusqu'à son remplacement par la protéine Gar1. Pour revue, Richard & Kiss, 2006.

(également connues sous le nom de RVB1 et RVB2 ou p50 et p55), Spagh et Nop17. Ces complexes interagissent aussi avec certaines protéines des snoRNP et pourraient assurer un remodelage de ces protéines lors de leur assemblage au snoRNA en cours de transcription (McKeegan et al, 2007 ; Boulon et al, 2008). Une autre protéine, le facteur Bcd1 est essentiel à l'accumulation de tous les snoRNA à boîtes C/D (Peng et al, 2003 ; Hiley et al, 2005) et interagit aussi avec NUFIP et certaines des protéines des snoRNP matures. Son rôle dans l'assemblage est en cours de décryptage. Bcd1 semble également interagir avec la machinerie de transcription polII. Nop56, la seule protéine qui n'est pas requise pour l'accumulation des snoRNA à boîtes C/D chez les eucaryotes, pourrait être le partenaire d'échange de Bcd1. Les récent travaux du laboratoire et d'autres équipes suggèrent qu'un grand nombre de facteurs puissent intervenir dans l'assemblage des snoRNP (McKeegan et al, 2007 ; Boulon et al, 2008).

- ***Rôle possible du complexe SMN dans la biogenèse des complexes snoRNP***

Des analyses d'interaction *in vitro* et des expériences de co-immunosélections *in vivo*, dans des cellules humaines, ont montré que le complexe SMN interagit directement avec les protéines Gar1 et Fibrillarine, via la protéine SMN (Liu & Dreyfuss, 1996 ; Pellizzoni et al, 2001a ; Jones et al, 2001 ; Whitehead et al, 2002). Le domaine Tudor serait nécessaire et suffisant pour l'interaction avec les protéines Gar1 et Fibrillarine. De plus, des mutations ponctuelles dans ce domaine (E104K, D105K, Q136A, L142A ou E134K) affecteraient considérablement son interaction avec les protéines Gar1 et Fibrillarine (Jones et al, 2001 ; Whitehead et al, 2002). De même, elle n'a pas lieu lorsque la protéine SMN porte des mutations rencontrées chez des patients atteints de SMA, où lorsque la boîte Y/G et la région codant l'exon 7 sont délétées (SMN Y272C, SMNΔY/G et SMNΔex7) (Pellizzoni et al, 2001a). L'interaction de ces deux protéines avec la protéine SMN requiert la présence de leurs domaines riches en arginines et glycines. Par contre, à la différence des protéines Sm, la méthylation de leurs arginines ne semblent pas être un facteur clé pour leur interaction avec la protéine SMN (Whitehead et al, 2002).

Les interactions détectées entre la protéine SMN et les protéines Fibrillarine et Gar1 suggèrent que le complexe SMN pourrait jouer un rôle dans l'assemblage des snoRNP. Il a été observé qu'un taux réduit de protéine SMN dans les cellules HeLa conduit à un défaut de stabilité du snoRNA U3 contrairement aux snoRNA U8 et U14 (Watkins et al, 2004). Cette diminution du taux de snoRNA U3 pourrait s'expliquer par une mauvaise efficacité d'assemblage en snoRNP. En ce qui concerne les snoRNP H/ACA, comme l'arrivée de la protéine Gar1 dans l'assemblage des snoRNP H/ACA est tardive, on peut imaginer que le complexe SMN en interagissant avec Gar1 intervienne dans une étape tardive d'assemblage des snoRNP H/ACA en contrôlant peut-être l'échange entre les protéines Gar1 et Naf1 ***(Figure 24)***.

De manière générale, le complexe SMN pourrait également participer aux dernières étapes d'assemblage des snoRNP C/D et H/ACA. En effet, en plus de son interaction avec Fibrillarine et Gar1, il interagit également avec la méthylase TGS1 et la protéine Lsm 4, deux protéines qui interviennent respectivement dans l'hyperméthylation et la maturation des extrémités 3' des snoRNA (Liu & Dreyfuss, 1996 ; Jones et al, 2001 ; Pellizzoni et al, 2001a ; Friesen & Dreyfuss, 2000 ; Brahms et al, 2001 ; Mouaikel et al, 2003a).

En conclusion, l'ensemble des données actuelles convergent vers un rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage de nombreuses particules ribonucléoprotéiques ubiquitaires. D'autres RNP abondantes dans les cellules, comme la particule de reconnaissance du signal (SRP), intervenant dans la sécrétion des protéines au réticulum endoplasmique, pourrait, elles aussi, nécessiter l'intervention du complexe SMN pour leur assemblage. L'un des objectifs de ma thèse a été d'étudier cette hypothèse. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus sera discuté dans la partie « *Résultats-Perspectives* » de ce manuscrit.

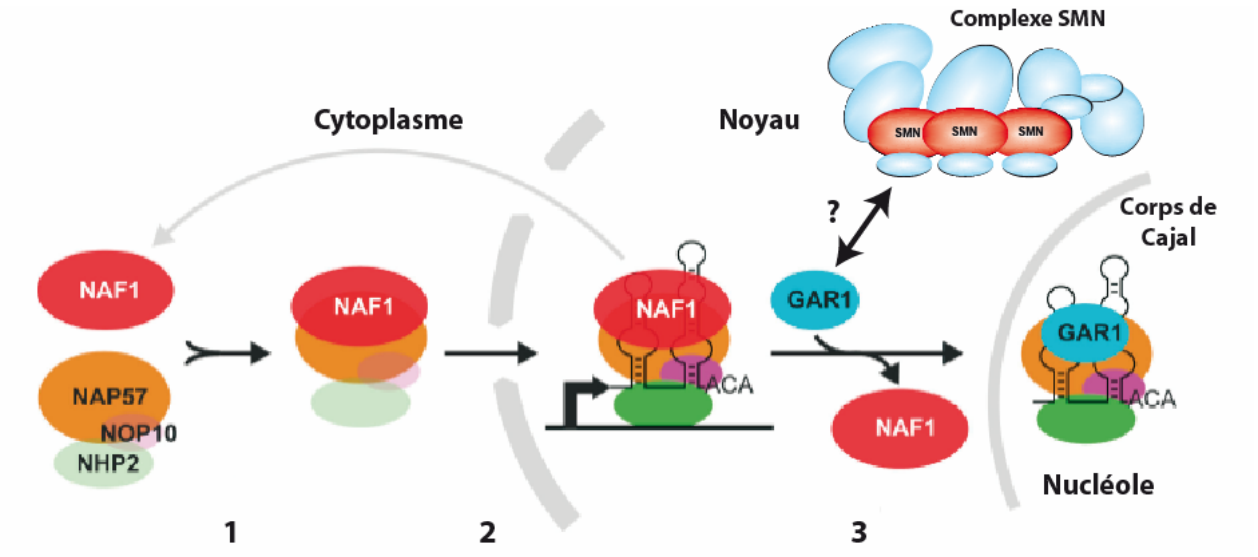


Figure 24 : Ordre d'assemblage des protéines sur les snoRNP H/ACA

L'assemblage des protéines sur les snoRNA H/ACA semble se dérouler en trois étapes : la protéine NAF1 s'associerait avec la protéine NAP57 dans le cytoplasme (**1**). Ce complexe serait recruté au site de transcription du snoRNA H/ACA, comme NOP10 et NHP2 (**2**). GAR1 remplacerait ensuite NAF1 pour former une snoRNP mature dans le nucléole et les corps de Cajal (**3**). Le complexe SMN en interagissant avec GAR1 pourrait participer à cette dernière étape. Adapté de Darzacq et al, 2006.

IV/ Liens entre la fonction du complexe SMN et la pathologie SMA

Alors que la pathologie SMA est liée à un défaut des motoneurones, on ne comprend toujours pas comment un déficit en protéine SMN, une protéine ubiquitaire, peut causer une pathologie restreinte à un type cellulaire. Une première hypothèse serait que les motoneurones soient plus sensibles à un défaut d'assemblage des UsnRNP que les autres types cellulaires. Ainsi, un défaut d'assemblage des UsnRNP conduirait à un défaut d'épissage d'un ou de plusieurs ARNm nécessaires au bon fonctionnement des motoneurones. On pourrait imaginer que des ARN pré-messagers tissus spécifiques qui contiendraient des sites d'épissage non optimaux pourraient être particulièrement sensibles à une réduction du taux de UsnRNP par rapport à d'autres ARN pré-messagers ***(Figure 25)*** (Eggert et al, 2006). Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi la réduction du taux de protéines impliquées dans la biogenèse des UsnRNP, comme observé dans le cas de la SMA, pourrait induire un phénotype spécifique, alors que ces protéines sont impliquées dans une fonction cellulaire ubiquitaire (Eggert et al, 2006). Nous verrons que les travaux de plusieurs équipes apportent des évidences allant dans le sens de cette hypothèse alors que d'autres apportent des contre-arguments.

Une autre hypothèse est que la protéine SMN et/ou le complexe SMN joue un rôle spécifique dans les motoneurones et qu'un défaut de ce rôle serait à l'origine de la pathologie SMA. Aucune donnée expérimentale ne permet, à ce jour, de démontrer cette hypothèse. Pourtant, de nombreuses expériences montrent l'existence d'un ou de plusieurs rôle(s) de la protéine SMN dans les neurones qui sont indépendants de sa fonction dans l'assemblage des UsnRNP.

1/ La SMA : un défaut d'assemblage des UsnRNP ?

Des travaux réalisés chez le poisson zèbre *Danio rerio* ont montré que l'extinction de l'expression de la protéine SMN, de même que celle de Gemin 2 ou pICln, causée par l'injection de morpholino anti-sens, induit des défauts de croissance et de

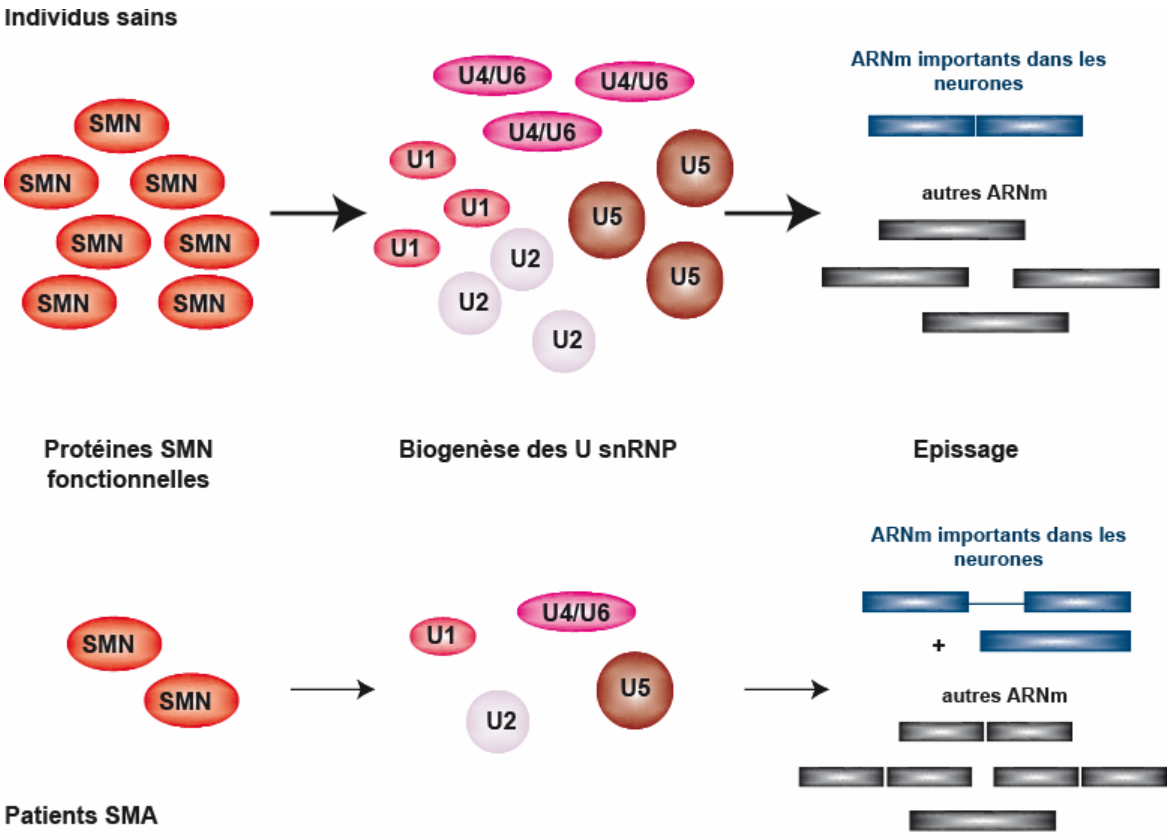


Figure 25 : Conséquences possibles d'un défaut de UsnRNP dans la pathologie SMA

La diminution du taux de protéines SMN pourrait conduire à une réduction du taux de UsnRNP spliceosomales. En conséquence, l'épissage des pré-ARNm contenant des sites d'épissage non optimaux (transcrits tissus-spécifiques) pourraient être compromis par rapport à d'autres ARNm. Ainsi, l'épissage inefficace d'ARNm important dans les neurones pourrait être à la base du phénotype spécifique observé dans la pathologie SMA. D'après Eggert et al, 2006.

branchements des motoneurones (McWhorter et al, 2003 ; Winkler et al, 2005 ; Carrel et al, 2006). L'équipe de U. Fisher a montré que l'injection de UsnRNP purifiées compense la perte de ces protéines, ce qui suggére un lien entre le défaut d'assemblage des UsnRNP et la dégénérescence des motoneurones dans la pathologie SMA. Cependant, il a été observé que l'injection d'ARNm codant des mutants de la protéine SMN incapables d'oligomérisation ou de fixer les protéines Sm et donc non fonctionnels pour l'assemblage des UsnRNP permet de restaurer la croissance des axones des motoneurones où l'expression de la protéine SMN avait été éteinte (Carrel et al, 2006). Ces travaux indiquent qu'en dépit des observations faites par l'équipe de U. Fischer, la dégénérescence des motoneurones observée chez le poisson zèbre présentant un taux réduit de protéines SMN, n'est sans doute pas due à un défaut d'assemblage des UsnRNP mais à un défaut d'une autre fonction de la protéine SMN. Les données d'autres expériences l'ont confirmé. En effet, les défauts de croissance et de branchements, provoqués par l'absence de Gemin 2, observés chez le poisson zèbre ne semblent par être restreint aux motoneurones (Winkler et al, 2005). Ces défauts seraient, en fait, secondaires et dus à un défaut global de la morphogenèse du poisson zèbre. Ainsi, contrairement à la protéine SMN, la protéine Gemin 2 ne jouerait pas un rôle spécifique dans la croissance des axones des motoneurones (McWhorter et al, 2008). Etant donné que les protéines SMN et Gemin 2 font toutes les deux partie du complexe SMN et que c'est le complexe SMN, en entier, qui est impliqué dans l'assemblage des UsnRNP, ces données sont en faveur d'un rôle spécifique de la protéine SMN.

Dans l'hypothèse où la pathologie SMA est due à un défaut d'assemblage des UsnRNP, une diminution de leur taux, dans des cellules où la protéine SMN est déficiente, devrait être mesurable. Pourtant, jusqu'à récemment, aucune équipe n'avait pu mettre en évidence une telle réduction quelque soit le type de cellules utilisées (cellules de poulet DT40 présentant un taux réduit de protéines SMN : (Wan et al, 2005) ; larves de drosophiles contenant des mutant SMN : (Rajendra et al, 2007) ; fibroblastes humains issus de patient atteint de SMA de type I : (Gabanella et al, 2007). Ces observations suggèrent que le taux de protéines SMN dans les cellules est en large excès par rapport au taux nécessaire pour permettre un assemblage correct des UsnRNP. Néanmoins, les équipes de L. Pellizzoni et de G. Dreyfuss ont pu montré une diminution faible mais significative du taux des UsnRNP majeurs et mineurs dans des cellules HeLa où le taux de protéines SMN est réduit, dans la

moelle épinière et dans d'autres tissus (cerveau, reins) de souris SMA (Zhang et al, 2008b ; Gabanella et al, 2007). Il faut noter que les UsnRNP mineures sont très peu abondantes et sont nécessaires à l'épissage de seulement 1% des introns; c'est pourquoi le taux de UsnRNP mineurs est probablement plus affecté par une réduction du taux de protéines SMN par rapport aux UsnRNP majeurs. De plus, l'épissage des introns mineurs est plus long et moins perfomant que celui des introns majeurs. Il a été proposé que l'epissage des introns mineurs soit une étape limitante dans l'expression des gènes qui en contiennent (Levine & Durbin, 2001 ; Patel et al, 2002). Bien qu'aucune démonstration claire n'ait été obtenue dans ce domaine, on peut imaginer que la diminution de la concentration en UsnRNP mineures conduise vraiment à rendre l'étape d'élimination des introns mineurs limitante. De manière intéressante, ces introns ne sont pas distribués au hasard dans le génome mais ils sont plutôt enrichis dans quelques familles de gènes (Wu & Krainer, 1999 ; Levine & Durbin, 2001 ; Sheth et al, 2006 ; Alioto, 2007). En particulier, les membres de la famille des gènes des canaux ioniques à voltage dépendant contiennent une fréquence inhabituellement élevée d'introns mineurs. Ces gènes contrôlent de nombreuses activités qui sont critiques dans la fonction neuronale et la contraction musculaire, incluant le potentiel d'action, les mécanismes de signalisation et de transmission synaptique, dont la déficience est la cause de plusieurs désordres neuromusculaires et neurologiques chez l'homme (Flink & Atchison, 2003 ; George, 2005 ; Vincent et al, 2006). Les travaux de l'équipe de G. Dreyfuss montrent aussi que la réduction du taux de protéines SMN engendrerait préférentiellement des défauts d'épissage de transcrits de gènes contenant un grand nombre d'introns, dans des tissus de souris SMA (Zhang et al, 2008b). Un défaut d'épissage de ces gènes pourrait contribuer, au moins en partie, à la sévérité de la pathologie SMA.

En conclusion, à l'heure actuelle, rien ne permet d'affirmer que la pathologie SMA est, uniquement, due à un défaut d'assemblage des UsnRNP et donc à un défaut d'épissage de certains ARNm. En outre, dans les neurones, les protéines SMN, Gemin 2, 3, 6, 7 et unrip ont été localisées à la fois dans le cytoplasme mais également dans les prolongements neuritiques (axones et dendrites) contrairement aux protéines Sm (Sharma et al, 2005 ; Zhang et al, 2006). L'absence des protéines Sm dans les prolongements neuronaux suggère un rôle spécifique de la protéine SMN et/ou du complexe SMN différent de celui

dans l'assemblage des UsnRNP. Comme nous allons le voir, de nombreux arguments ont été apportés en faveur d'un rôle de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans le transport des ARNm dans les neurones.

2/ La SMA : une fonction spécifique de la protéine SMN et/ou du complexe SMN ?

2.1/ Un rôle dans le transport des ARNm ?

2.1.1/ Le transport des ARNm et le mécanisme de traduction localisée (pour revue, Dahm et al, 2007)

Le transport d'ARNm est un mécanisme largement employé pour générer une distribution asymétrique des protéines dans de nombreux systèmes biologiques (pour revues, Dahm et al, 2007 ; Dahm & Macchi, 2007). Dans le système nerveux, le transport d'ARNm joue un rôle crucial au cours du développement pour permettre aux neurones d'acquérir leur architecture allongée et ramifiée, adaptée à leurs fonctions, mais également dans l'organisme adulte pour établir, maintenir des connexions synaptiques fonctionnelles et pour la régénération axonale après dégradation (pour revue, Lin & Holt, 2007).

- ***Le transport des ARNm au sein de particules***

Les premières purifications de granules à ARN révèlent la présence de nombreuses protéines ***(Tableau V)*** (Brendel et al, 2004 ; Villace et al, 2004 ; Kanai et al, 2004 ; Elvira et al, 2006 ; Jonson et al, 2007). Certaines de ces protéines sont communes à tous les granules. Par contre, d'autres sont spécifiques à certains types de granules, ce qui indique la présence de différents types de granules à ARN dans les neurones.

Dans les neurones, le processus de localisation d'ARNm spécifiques peut être subdivisé en plusieurs étapes (pour revue, Dahm et al, 2007). La première étape a lieu dans le noyau où des éléments de séquences des ARNm sont reconnus par des protéines de liaison aux ARN. Cette étape est importante pour la localisation cytoplasmique propre à chaque ARNm (pour revue, St Johnston, 2005). Pour exemple, la protéine ZBP1 s'associe à l'ARNm de la β-actine dès sa transcription dans le noyau et est nécessaire à son transport dans les neurites (Ross et al, 1997 ; Eom et al, 2003 ; Oleynikov & Singer, 2003). La protéine

Kanai *et al*., 2004 protéines associées à KIF5	**Brendel *et al*., 2004 protéines associées à Staufen**	**Villacé *et al*., 2004 protéines associées à Staufen**	**Elvira *et al*., 2006**	**Jonson *et al*., 2007 protéines associées à IMP1**
hnRNP :				
hnRNP-D				hnRNP-D
hnRNP-A1				
SYNCRIP/hnRNP-Q			SYNCRIP/hnRNP-Q	SYNCRIP/hnRNP-Q
hnRNP-R				hnRNP-R
hnRNP-A/B				hnRNP-A/B
				hnRNP-A2/B1
hnRNP-U	hnRNP-U	hnRNP-U		hnRNP-U
			hnRNP-K	
			hnRNP-C	
			hnRNP-H	
			hnRNP-M	
			hnRNP-L	hnRNP-L
Hélicases à boîte DEAD :				
DDX3				
DDX1				
			DEAD box 6	
			DEAD box 9	
			NORP1	
			eIF4A	
			DEAD box BAT-1	
	RHA	RHA		RHA
Autres protéines de liaison aux ARN :				
FMRP	FMRP	FMRP	FMRP	
FXR1				
FRX2				
Staufen	Staufen	Staufen	Staufen	
Nucléoline	Nucléoline	Nucléoline	Nucléoline	Nucléoline
			ZBP2/MARTA1/KSRP	
			G3BP2	
			PTB	
	PABP	PABP	PABP	PABP
			Matrin-3	
			PAI-1 RNA binding	
			Y box-binding protein (mYB-1b)	Y box-binding protein (mYB-1b)
			CYFIP2	
			RACK	
PSF				
TLS				
ALY				ALY
NonO				
				CBP80
EF-1α	EF-1α			
Protéines moteurs et protéines du cytosquelette :				
	kinésine	kinésine		

Kanai *et al*., 2004 protéines associées à KIF5	**Brendel *et al*., 2004 protéines associées à Staufen**	**Villacé *et al*., 2004 protéines associées à Staufen**	**Elvira *et al*., 2006**	**Jonson *et al*., 2007 protéines associées à IMP1**
Protéines moteurs et protéines du cytosquelette (suite) :				
	dynéine	dynéine		
		myosine		
	tubulineα	tubulineα	tubulineα	
	tubulineβ	tubulineβ	tubulineβ	
		β-actine	β-actine	
		Tau		
		internexineα		
Protéines controlant le cytosquelette:				
		Rac1		
		Cdc42		
		IQGAP1		
Autres protéines :				
Purα			Purα	
Purβ			Purβ	
CGI-99			CGI-99	
HSPC117				
	NFAR			
	protéines ribosomales	protéines ribosomales	protéines ribosomales	protéines ribosomales
		Ras GAP		
		ρ-Associated protein kinase II		
ELAV-like protein :				
			ELAV-like2 (Hu-B)	
			ELAV-like3(Hu-C)	
			ELAV-like4 (Hu-D)	
			ETR-R3B	

Tableau V: Composition en protéines des différent types de granules à ARN isolés par plusieurs équipes

D'après Kanai et al, 2004 ; Brendel et al, 2004 ; Villace et al, 2004 ; Elvira et al, 2006 ; Jonson et al, 2007.

ZBP2 se lie également à l'ARNm de la β-actine dans le noyau, ce qui affecte sa localisation cytoplasmique (Gu et al, 2002). D'autres protéines jouent des rôles similaires : Staufen-1, Staufen-2, hnRNP-A2, … (pour revues, Roegiers & Jan, 2000 ; Carson & Barbarese, 2005 ; Miki et al, 2005). Dans une seconde étape, après l'export dans le cytoplasme, de nouveaux facteurs s'associent pour former des particules de transport actives ou granules à ARN ***(Figure 26)***. Ces particules amènent les ARNm à leur destination, qui sont des sites de synthèse locale. Ce transport se fait le long des microtubules avec l'aide de molécules moteurs de la famille des kynésines et des dynéines (pour revues, Hirokawa, 1998 ; Hirokawa & Takemura, 2005). La plupart des composants du cytosquelette et des molécules moteurs impliqués dans ces transports ont été identifiés (pour revues, Hirokawa & Takemura, 2005 ; St Johnston, 2005 ; Hirokawa, 2006). A ce jour, une seule protéine adaptatrice couplant les granules à ARN aux molécules moteurs est connue. Il s'agit de la protéine KIF3C, qui interagit avec la protéine FMRP et colocalisent au sein des mêmes granules de transport (Davidovic et al, 2007). Par contre, peu d'informations sont disponibles sur les molécules et les mécanismes qui permettent à ces RNP d'atteindre leur destination finale. Finalement, dans la dernière étape, des stimuli spécifiques induisent la traduction locale des ARNm (pour revue, Dahm et al, 2007). Durant le transport, les ARNm sont maintenus dans un état réprimé afin d'éviter la synthèse inappropriée des protéines correspondantes. Ce sont des protéines telles que CPEB (pour revue, Richter, 2007), ZBP1 (Huttelmaier et al, 2005), FMRP (pour revue, Bardoni et al, 2006) et RNG 105 (*RNA granule 105*), constituants de ces particules, qui seraient chargées de bloquer leur traduction (pour revue, Sossin & DesGroseillers, 2006). De plus, la protéine hnRNP-A2 réprimerait la traduction de certains ARNm dans les dendrites par interaction avec la protéine hnRNP-E1 (Kosturko et al, 2006). Certains granules contiendraient, également, des miRNA qui pourraient jouer un rôle essentiel dans le contrôle de la traduction dans les neurones (pour revue, Dahm et al, 2007). Enfin, deux petits ARN non codants : BC1 chez les rongeurs et son homologue fonctionnel, BC200 chez l'homme, pourraient également jouer un rôle dans la régulation de la traduction localisée (pour revues, Cao et al, 2006 ; Dahm et al, 2007). Ces deux ARN font partie de mon travail de thèse. Ils seront présentés de manière plus détaillée dans la troisième partie de cette introduction. La traduction serait arrêtée aux stades d'initiation ou d'élongation selon que les ARNm soient associés ou non aux ribosomes (pour revue, Sossin & DesGroseillers, 2006).

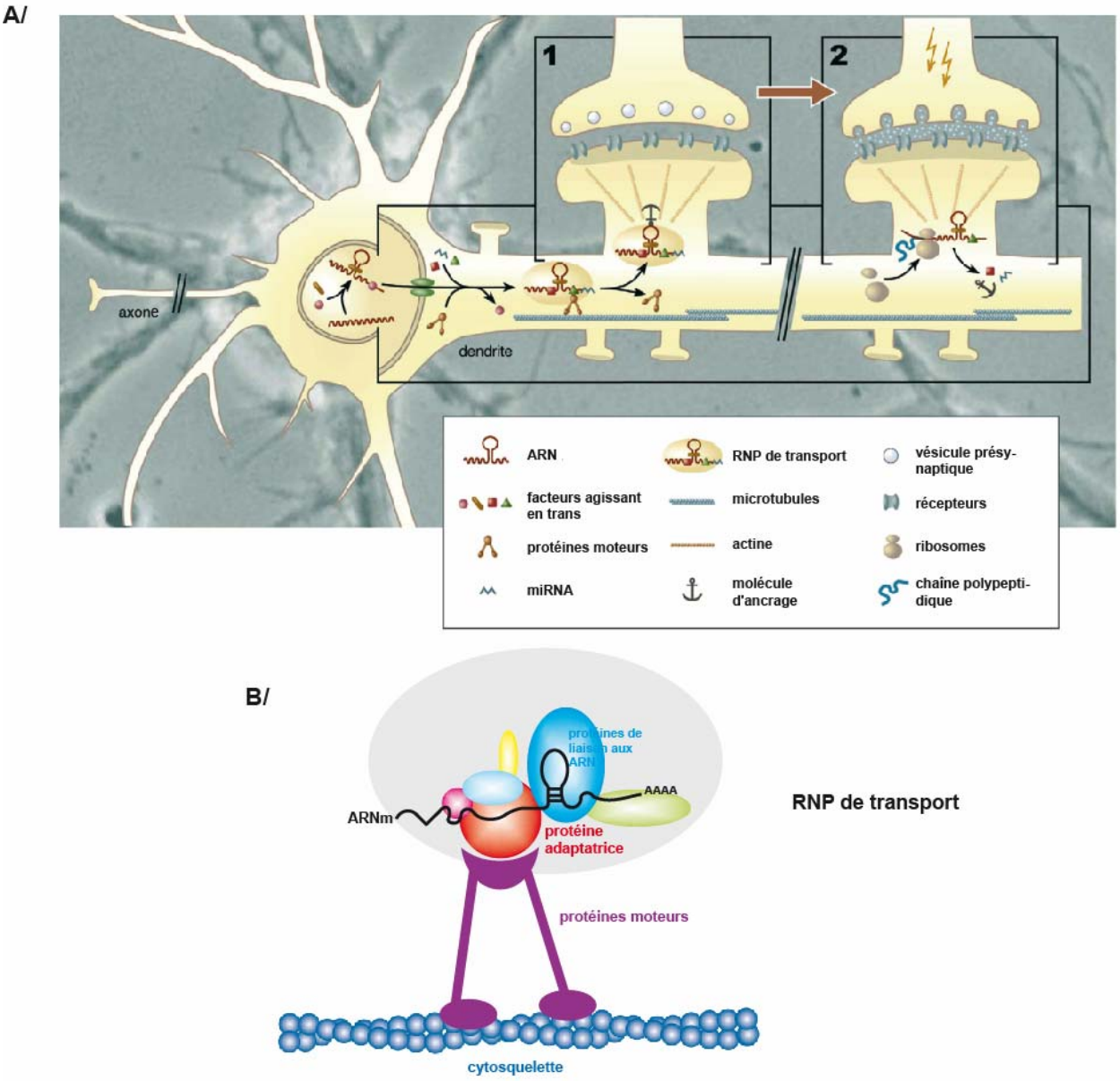


Figure 26 : Transport des ARNm dans les neurones

A/ Dans le noyau, les transcrits naissants s'associent avec un premier ensemble de protéines important pour leur localisation. Après l'export du noyau, d'autres protéines s'associent aux ARNm pour former une particule ou RNP de transport. Avec l'aide de protéines moteurs, telles que les protéines de la famille des kynésines et des dynéines, ces particules sont transportées le long des microtubules jusqu'aux dendrites. L'encart 1 montre l'ancrage hypothétique des RNP au niveau de sites spécifiques dans les épines dendritiques. Puis des stimuli spécifiques induisent la traduction des ARNm (encart 2). D'après la revue, Dahm et al, 2007. **B/** Représentation schématique d'une particule de transport des ARNm. D'après Shav-Tal & Singer, 2005.

Récemment, les évènements de signalisation et les mécanismes moléculaires permettant le passage de la forme silencieuse à l'activation de la traduction ont commencé à être élucidés (Huttelmaier et al, 2005 et pour revue, Dahm & Kiebler, 2005).

Deux types de transport ont été observés dans les neurones. Un transport du corps du neurone vers l'extrémité de l'axone, le transport est alors dit antérograde et de l'extrémité vers le corps cellulaire, le transport est alors dit rétrograde. Le transport antérograde est assuré par les molécules moteurs de la familles des kynésines, alors que le transport rétrograde est assuré par les molécules moteurs de la familles des dynéines (pour revue, Goldstein & Yang, 2000). Le transport rétrograde est rapide : 1 à 5µm/sec, alors que la vitesse du transport antérograde varie selon le type de molécules transportées. Le transport rétrograde permettrait l'élimination des déchets, il permet le retour des molécules membranaires vers le corps cellulaire afin qu'elles y soient dégradées, voire recyclées. Cependant, l'identité exacte des molécules qui retournent vers le corps cellulaire n'est pas connue (pour revue, Goldstein & Yang, 2000).

- ***Transport des ARNm et plasticité synaptique***

Dans les neurones matures, l'établissement des contacts synaptiques est déterminé par la synthèse de protéines spécifiques qui a lieu au niveau de la membrane synaptique (Martin & Zukin, 2006). La première indication qui montre que les dendrites sont autonomes en matière de traduction vient de la découverte de complexes polyribosomiques au niveau des synapses (pour revues, Steward & Schuman, 2001 ; Steward & Schuman, 2003 ; Schuman et al, 2006). Cette présence suggère que chaque synapse est autonome dans le contrôle de sa synthèse protéique (pour revue, Sutton & Schuman, 2006). Cette synthèse locale est une adaptation du système nerveux pour permettre une régulation rapide (Kiebler & DesGroseillers, 2000 ; Steward & Schuman, 2003). En effet, la synthèse protéique locale permettrait aux synapses de maintenir des connexions synaptiques fonctionnelles grâce à une production rapide de protéines à partir d'ARNm pré-existants. La synthèse protéique locale dans les dendrites apparaît comme un mécanisme clé contribuant notamment à la plasticité synaptique qui serait à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation (pour revues, Sutton & Schuman, 2006 ; Pfeiffer & Huber, 2006). La plasticité synaptique repose sur le

principe selon lequel l'efficacité de la transmission synaptique entre deux neurones est fonction de l'importance des échanges ayant existé entre ces neurones. Les neurones gardent ainsi les traces de leurs expériences passées. La plasticité synaptique intervient donc à la fois dans le développement et la maturation synaptique. Sa dérégulation pourrait être à la source de nombreuses altérations des fonctions cognitives. Il existe deux grandes formes de plasticité synaptique, la potentialisation à long terme (LTP) : un mécanisme de stockage de l'information et au contraire la dépression à long terme (LTD) : un mécanisme d'oubli (pour revue, Sutton & Schuman, 2006). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique sont nombreux, complexes et varient suivant le type cellulaire considéré. Par ailleurs, selon le stimulus appliqué, les récepteurs à l'origine de la transduction du signal peuvent être différents. Ainsi, le glutamate qui est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central agit sur deux types de récepteurs, les récepteurs ionotropiques, qui sont des canaux ioniques dont l'ouverture est déclenchée par la fixation du ligand, et les récepteurs métabotropiques, qui sont couplés à une protéine G et induisent une dépolarisation en activant une cascade de messagers secondaires (pour revue, Pfeiffer & Huber, 2006). La protéine FMRP aurait également un rôle essentiel dans ces mécanimes. Elle semble, en effet, impliquée dans la régulation de la synthèse d'ARNm en réponse à la stimulation des récepteurs métabotropiques (pour revue, Grossman et al, 2006). Les caratéristiques structurales et fonctionnelles de cette protéine, qui a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse, seront détaillées dans le deuxième chapitre de cette introduction.

- ***Le transport des ARNm au cours du développement***

Un des aspects les plus remarquables du développement du système nerveux est sans doute la capacité des axones en croissance à trouver leurs cellules cibles. Cette capacité est liée aux propriétés du cône de croissance, une structure située à l'extrémité de l'axone qui s'allonge. Le cône de croissance est formé de divers prolongements qui avancent et reculent à la recherche de signaux de guidage, un peu comme des doigts qui s'étendent et se rétractent pour palper ce qu'il y a aux alentours (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996 ; Dickson, 2002). C'est donc en interagissant avec son environnement que le cône de croissance trouve des signaux qui le guident vers l'endroit où il doit établir des connexions avec d'autres neurones. Ces signaux de guidage sont des molécules qui orientent le cône de

croissance sur la direction à suivre (pour revues, Chilton, 2006 ; Lin & Holt, 2007). La traduction localisée de certaines protéines à l'extrémité de l'axone en croissance est nécessaire à ce processus.

2.1.2/ Rôle de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans le transport des ARN ?

Le rôle précis de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans les neurones et sa fonction possible dans les prolongements neuronaux n'est pas connu. Cependant, de nombreux travaux laissent aujourd'hui penser que la protéine SMN et/ou le complexe SMN puissent être impliqués dans la localisation et la traduction de certains ARNm dans les cônes de croissance (Bechade et al, 1999 ; Pagliardini et al, 2000 ; Jablonka et al, 2001 ; Fan & Simard, 2002 ; Rossoll et al, 2003 ; Rossoll et al, 2002 ; Zhang et al, 2003 ; Sharma et al, 2005 ; Zhang et al, 2006). Plus précisément, la protéine SMN est présente dans des granules distribués dans les axones en développement et dans les cônes de croissance ***(Figure 27)*** (Zhang et al, 2003). La séquence QNQKE contenue dans la région codée par l'exon 7 de l'ARNm de SMN serait suffisante pour assurer la localisation cytoplasmique de la protéine SMN. En outre, cette séquence, de concert avec un autre domaine de la protéine SMN, encore non identifié, assurerait la localisation dans les neurites (Zhang et al, 2003). Ces granules contiennent également des ARNr, des ribosomes (Zhang et al, 2003), des ARNm et la PABP (Zhang et al, 2007). La présence de ces composants avec la protéine SMN laisse penser que les granules contenant la protéine SMN puissent être des granules de transport à mouvements rapides, bi-directionnels et dépendant du cytosquelette. Il semble, en effet, que les microtubules assurent des mouvements sur de longues distances et que les filaments d'actine assurent des mouvements de courtes distances (Zhang et al, 2003).

Comme précédemment mentionné, la synthèse protéique locale dans les axones et les dendrites est cruciale pour la croissance des axones et leur régénération, ainsi que pour la formation des synapses et leur plasticité. Des motoneurones déficients en protéines SMN ont une croissance axonale ralentie et des malformations synaptiques. L'ensemble des ces observations suggère que la protéine SMN puisse avoir un rôle dans l'assemblage, la régulation de la traduction et/ou le transport des mRNP dans les neurones.

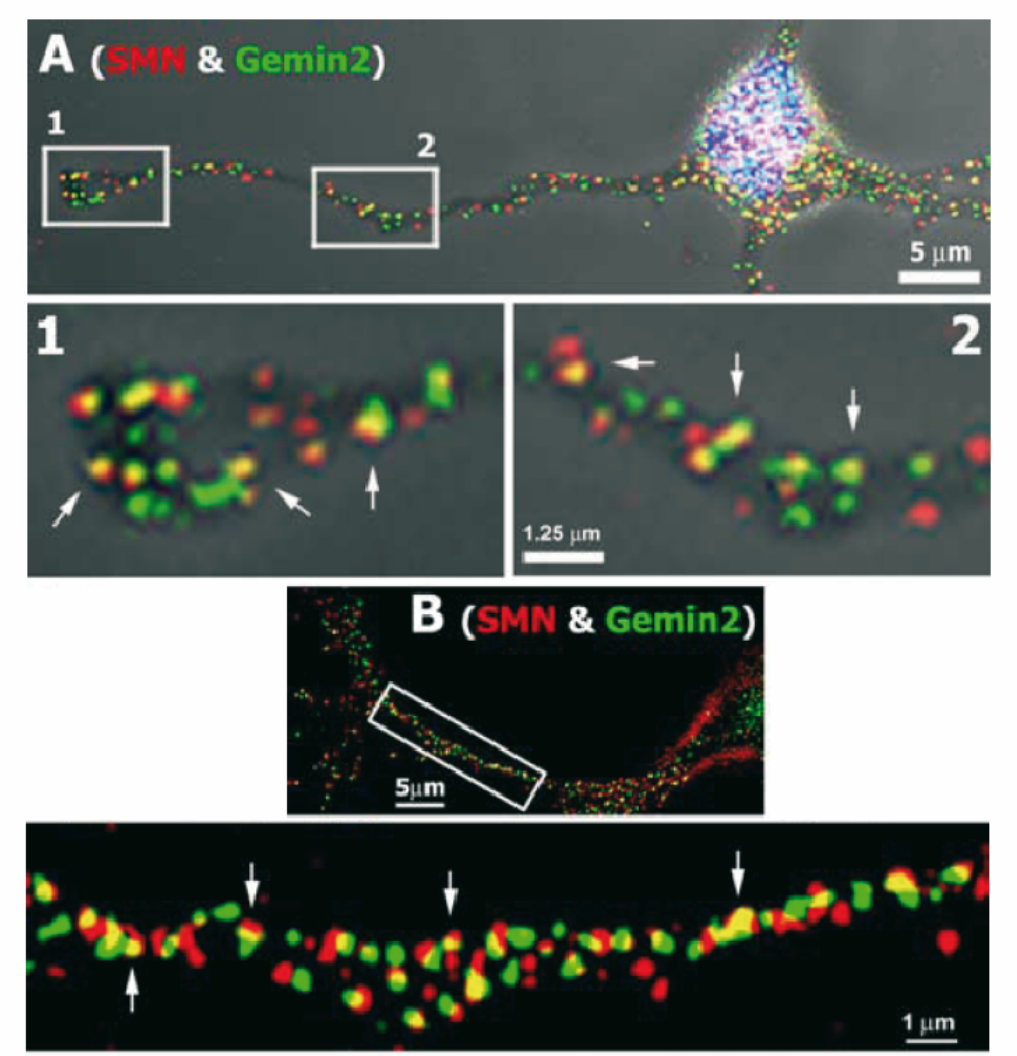


Figure 27 : Localisation des protéines SMN et Gemin 2 dans des granules distribués dans les axones en développement et dans les cônes de croissance

A/ Détection par double immunofluorescence des protéines SMN (rouge) et Gemin 2 (vert) dans des neurones en culture. Les encarts 1 et 2 montrent un agrandissement des deux régions encadrées. La colocalisation des deux protéines dans les cônes de croissance (encart 1) et dans les neurites (encart 2) apparaît en jaune. Les flèches indiquent les granules contenant à la fois les protéines SMN et Gemin 2. **B/** Détection par double immunofluorescence des protéines SMN (rouge) et Gemin 2 (vert) dans des cellules ES dérivées de motoneurones différentiés. La colocalisation des deux protéines dans les neurites apparaît en jaune. Les flèches indiquent les granules contenant à la fois les protéines SMN et Gemin 2. D'après Zhang et al, 2006.

Cette hypothèse est confortée par le fait qu'une réduction du taux de protéines SMN, dans des motoneurones isolés d'un modèle murin d'amyotrophie spinale, induit une réduction du taux d'ARNm de la β-actine dans la partie distale des axones et de la β-actine dans les cônes de croissance. Les axones seraient en outre plus courts et les cônes de croissance seraient de plus petites tailles, suggérant que la protéine SMN puisse être impliquée dans le transport axonal de l'ARNm de la β-actine (Rossoll et al, 2003). De plus, la protéine SMN interagit avec la protéine hnRNP-Q/R, une protéine retrouvée dans les granules à ARN ***(Tableau V, pages 76 et 77)*** (Rossoll et al, 2002 ; Mourelatos et al, 2001). Bien que le rôle de la protéine hnRNP-Q/R dans le transport des ARNm n'a pas été caractérisé, une hypothèse est que cette protéine, en se liant à la région 3'UTR de l'ARNm de la β-actine, jouerait un rôle dans sa localisation dans les neurites (Rossoll et al, 2003 ; Rossoll et al, 2002). La protéine SMN en association avec la protéine hnRNP-Q/R faciliterait son interaction avec l'ARNm de la β-actine.

Comme la protéine SMN, les protéines Gemin 2, 3, 6, 7 et unrip sont localisées à la fois dans le cytoplasme au niveau du corps cellulaire des neurones et dans les prolongements neuritiques (Jablonka et al, 2001 ; Sharma et al, 2005 ; Zhang et al, 2006). La protéine SMN et les protéines Gemin 2 et 3 colocaliseraient, en partie, au sein de granules dans les prolongements neuronaux et dans les cônes de croissance de cellules d'hippocampe de rat, dans les motoneurones et dans des cellules ES dérivées de motoneurones (40% des protéines Gemin 2 et 48% des protéines Gemin 3 colocalisent dans des granules avec la protéine SMN) (Zhang et al, 2006). Selon les granules, la protéine SMN peut donc être seule ou accompagnée des protéines Gemin 2 ou Gemin 3 (Zhang et al, 2006). De plus, dans un même granule de transport une interaction directe pourrait s'établir entre les protéines SMN et Gemin 2 (Zhang et al, 2006). L'ensemble de ces résultats indiquent l'existence, dans les prolongements neuronaux, de complexes de différentes compositions protéiques contenant la protéine SMN.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans les neurones, plusieurs équipes recherchent, actuellement, de nouveaux candidats protéiques qui pourraient coopérer avec la protéine SMN dans ses fonctions neuronales. Ainsi, récemment, la protéine KSRP, une protéine impliquée dans de nombreux processus tels que l'épissage, la transcription, l'éditing, le transport et la stabilité de certains ARNm, a été identifiée comme partenaire de la protéine SMN dans les neurones (Tadesse et

al, 2008). La protéine KSRP, également connue sous le nom de FBP2 (*Fuse Binding protein 2*), est l'homologue de ZBP2 (*Zipcode Binding Protein 2*) de poulet et de la protéine MARTA 1 chez le rat. Ces protéines sont des composants des granules à ARN ***(Tableau V, pages 76 et 77)*** et sont, respectivement, impliquées dans la localisation neuronale de l'ARNm de la β-actine et de l'ARNm de MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) (Gu et al, 2002 ; Rehbein et al, 2002). KSRP interagit directement avec le domaine Tudor de la protéine SMN par ses domaines riches en RG. En effet, la présence de mutations dans ce domaine retrouvées chez les patients atteints de SMA de type I (E134K, Q136E, I116F et A111G) semble abolir l'interaction de SMN avec KSRP *in vitro* (Tadesse et al, 2008). De plus, l'interaction entre les deux protéines est dépendante de la méthylation de KSRP par la protéine CARM1. La protéine KSRP, comme la protéine SMN est retrouvée dans des granules distribués dans les extensions neuritiques. L'analyse quantitative indique que 23,6% des granules contenant KSRP contiennent également SMN et que 21,4% des granules contenant SMN contiennent également KSRP (Tadesse et al, 2008). Comme pour la distribution des protéines Gemin 2 et 3, ces résultats reflètent l'hétérogénéité en protéines des granules de transport contenant la protéine SMN. De plus, le taux de protéine KSRP est diminué dans des tissus de souris modèle de SMA, en corrélation avec une stabilisation anormale de l'ARNm de p21 (Tadesse et al, 2008). Cet ARN est une cible de la protéine KSRP qui recrute certains ARNm en vue de leur dégradation par l'exosome (Briata et al, 2005). Il est donc possible que certains ARNm soient stabilisés chez les patients atteints de SMA, ce qui pourrait contribuer à la sévérité de la maladie. Il est important de noter que la protéine p21 est un régulateur négatif du cycle cellulaire et joue un rôle crucial dans la croissance des neurites (pour revue, Boulaire et al, 2000). L'ensemble de ces travaux indique que la protéine SMN jouerait un rôle dans le transport et stabilité de certains ARNm cibles de KSRP.

De manière intéressante, une autre protéine de la même famille que KSRP, la protéine FBP pourrait aussi être associée à la protéine SMN ***(Tableau IV, pages 36 et 37)*** (Williams et al, 2000). Cette protéine est impliquée dans la transcription du gène *c-myc*, dans la réplication du virus de l'hépatite C ainsi que dans la stabilité de l'ARNm GAP-43 (Duncan et al, 1994 ; Irwin et al, 1997 ; Zhang et al, 2008a). Un rôle ubiquitaire de la protéine SMN dans la stabilité des ARNm pourrait donc être envisagé. De plus, l'existence possible d'une interaction entre les protéines SMN et NFAR-2 apporte un nouvel argument en faveur de cette

hypothèse ***(Tableau IV, pages 36 et 37)*** (Saunders et al, 2001). NFAR-1 et NFAR-2 sont deux protéines issues d'un épissage alternatif. NFAR-2 contient un domaine supplémentaire en C-terminal par rapport à NFAR-1 (Saunders et al, 2001). Un rôle dans l'export nucléaire de certains ARNm et dans la régulation de la traduction vient d'être proposé pour ces deux protéines (Pfeifer et al, 2008). Enfin, unrip, un des composants du complexe SMN, est associé *in vitro* et *in vivo* avec les ARNm des protéines d'export nucléaire de la famille NXF (*Nuclear eXport Factor*) et avec l'ARNm de la protéine MAP1B (*Microtubule-Associated Protein 1B*) (Tretyakova et al, 2005). Les protéines de la famille MAP1 seraient des adaptateurs moléculaires permettant la liaison de protéines spécifiques aux microtubules (pour revue, Halpain & Dehmelt, 2006). Il est donc possible que le complexe SMN, via unrip et les protéines NXF, puisse jouer un rôle dans l'export nucléaire des mRNP à la fois dans les cellules neuronales et non-neuronales (Tretyakova et al, 2005).

D'autres protéines, associées directement ou indirectement à la protéine SMN, dans des cellules non-neuronales, sont présentes dans les granules à ARN : l'ARN hélicase A (RHA) et la nucléoline ***(Tableau IV et V)*** (Pellizzoni et al, 2001b ; Lefebvre et al, 2002). Cependant, il reste encore à savoir si ces protéines sont également associées à la protéine SMN dans les neurones et quel est leur rôle.

Au laboratoire, notre intérêt s'est porté sur l'association du complexe SMN avec la protéine FMRP, une protéine capable de se lier aux ARN et qui est impliquée dans le syndrôme de l'X fragile, la première cause de retard mental (pour revue, Bardoni et al, 2006). Nous détaillerons, dans la seconde partie de cette introduction, le rôle de la protéine FMRP dans les cellules. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus sera discuté dans la partie « *Résultats-Perspectives* » de ce manuscrit.

2.2/ La protéine SMN axonale : a-SMN

Récemment, une étude a permis d'identifier une nouvelle isoforme de SMN spécifique des axones : a-SMN (Setola et al, 2007). Cette protéine est le produit du gène *SMN1*, c'est pourquoi sa perte pourrait être un nouvel élément déterminant dans la pathologie SMA. Cette isoforme est plus courte : 19 kD contre 36 kD pour la protéine pleine longueur.

Elle est issue d'un processus d'épissage alternatif du gène *SMN1* permettant l'inclusion de l'intron 3. Cet intron possède un motif polyadénines, motifs qui sont généralement la cible de mutations et/ou de délétions. Or celui-ci est très conservé (Sasongko et al, 2008). Cette faible mutabilité suggère l'existence de mécanismes permettant de conserver le cadre de lecture de la protéine a-SMN (Sasongko et al, 2008). La protéine a-SMN ne comporte que les régions codées par les exons 1, 2a, 2b et 3 du fait de la présence d'un codon stop en aval de la jonction exon3/intron3. a-SMN a été retrouvée dans des tissus de type neuronaux et non neuronaux et serait réprimée au cours du développement. En effet, dans la moelle épinière, a-SMN est sélectivement exprimée dans les motoneurones en développement et est particulièrement localisée dans les axones et les dendrites. Bien que la surexpression de la protéine a-SMN stimule la croissance des axones, la fonction de cette isoforme reste encore à définir (Setola et al, 2007).

2.3/ La protéine SMN et la dynamique de l'actine

La régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine est particulièrement importante dans les neurones. En effet, le cytosquelette d'actine est nécessaire à la croissance neuronale et à la motilité des cônes de croissance (Kuhn et al, 2000). Sa régulation est assurée par plusieurs protéines qui se fixent à l'actine. L'une de ces protéines régulatrices est la profiline. La profiline existe sous deux isoformes (Schluter et al, 1997) : la profiline I (PFNI) et la profiline II (PFNII) qui diffèrent par leur affinité aux motifs polyprolines et par leur distribution tissulaire. La profiline II est hautement concentrée dans le système nerveux central et a la capacité de s'associer à la région riche en prolines de la protéine SMN (Giesemann et al, 1999). De plus, elle colocalise avec la protéine SMN dans le cytoplasme, les Gems et les cônes de croissance (Sharma et al, 2005).

La profiline est un régulateur négatif de la polymérisation de l'actine car elle séquestre les monomères d'actine. Elle permet également la polymérisation de l'actine en relarguant ces monomères et en les ajoutant aux extrémités des microfilaments d'actine (Carlier et al, 1997b ; Carlier et al, 1997a ; Carlier & Pantaloni, 1997). Dans toutes les cellules eucaryotes, l'actine se présente sous deux formes interconvertibles et en équilibre dynamique, une forme monomérique, l'actine globulaire (G) et une forme polymérique,

l'actine filamenteuse (F). La dérégulation de la protéine SMN dans des cellules neuronales en culture semble avoir pour conséquences une modification du ratio actine G/actine F avec une augmentation de la quantité d'actine F (van Bergeijk et al, 2007). La protéine SMN seule n'a pas d'effet sur la polymérisation de l'actine, *in vitro*, mais l'activerait quand elle est complexée à la profiline II (Sharma et al, 2005). Ces résultats suggèrent que la protéine SMN pourrait modérer l'activité inhibitrice de la profiline II sur la polymérisation de l'actine et jouer un rôle de régulateur dans la formation des filaments d'actine le long des axones. En effet, l'extinction de la protéine SMN, dans des cellules neuronales en culture, montrent une augmentation du taux de profiline II dans les neurones (Bowerman et al, 2007). En fait, un défaut de protéines SMN contribuerait à augmenter la disponibilité de la profiline II (Bowerman et al, 2007) qui induirait alors une polymérisation rapide de l'actine G en actine F. De ce fait, la réduction du taux de protéine SMN causée par la pathologie SMA pourrait avoir comme effet des défauts de ciblage d'axones vers des neurones précis par dérégulation de la polymérisation des microfilaments d'actine.

2.4/ La protéine SMN dans les muscles

Alors que l'atrophie des muscles semble une conséquence de la dégénérescence des motoneurones, dans la pathologie SMA, la possibilité que les muscles aient un rôle direct est, également, envisagée. En effet, la réduction de protéine SMN chez la drosophile (dSMN) entraîne la perte d'expression de Act88F, une isoforme de l'actine spécifique des muscles indirects du vol et une désorganisation neuromusculaire sévère (Rajendra et al, 2007). De plus, la protéine dSMN est localisée dans les sarcomères des muscles du vol et interagirait avec l'α-actinine. L'α-actinine est une protéine connue pour jouer un rôle majeur dans le pontage des filaments d'actine à travers de nombreux types cellulaires, dont le muscle (Clark et al, 2002). Très récemment, il a été montré chez la souris que le complexe SMN en entier se localiserait dans les disques Z des sarcomères et colocaliserait avec l'α-actinine à la fois dans les myofibrilles squelettiques et cardiaques (Walker et al, 2008). La protéine SMN pourrait donc être une protéine des sarcomères requise dans l'expression de l'actine dans le muscle.

Chapitre II : Le syndrome de l'X fragile, la protéine FMRP absente

I/ Le Syndrome de l'X Fragile : des causes génétiques aux causes moléculaires

1/ Le syndrome de l'X fragile : une maladie monogénique à expansion de triplets nucléotidiques

Le syndrome de l'X fragile (OMIM #309550) est la cause la plus fréquente de retard mental héréditaire. Il s'agit d'une affection liée au chromosome X. Son incidence est estimée à environ 1/4000 chez les hommes. Il est également responsable d'un retard mental léger à modéré chez une femme sur 7000 environ (Turner et al, 1996 ; pour revues, Chelly & Mandel, 2001 ; Crawford et al, 2001 ; Bardoni & Mandel, 2002 ; O'Donnell & Warren, 2002 ; Penagarikano et al, 2007). L'anomalie génétique consiste en une expansion instable d'une répétition de trinucléotides (CGG), dans la région 5' non traduite du gène *FMR1*, expansion qui peut augmenter au fil des générations. Cette expansion est concomittante à une hyperméthylation des répétitions ainsi que de l'îlot CpG de la région promotrice du gène *FMR1* (Verkerk et al, 1991 ; Oberle et al, 1991). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'instabilité des allèles prémutés et mutés (pour revue, Stoyanova et al, 2004). En fonction du nombre de répétitions, on peut décrire trois types de situations pathologiques détaillées dans la ***figure 28***.

Les symptômes associés au syndrome de l'X fragile sont des troubles cognitifs (déficience intellectuelle, difficultés de raisonnement, d'apprentissage, ...) des troubles comportementaux (hyperactivité, impulsivité, aggressivité, tics, fuite du regard, ...) dont certains sont communs à ceux observés en cas d'autisme (Hagerman & Hagerman, 2002 ; Cornish et al, 2004 et pour revue, Garber et al, 2008). D'autres caractéristiques physiques ont été identifiées : dysmorphie faciale, atteinte des tissus conjonctifs, macroorchidie, problèmes orthopédiques,... (pour revue, Garber et al, 2008).

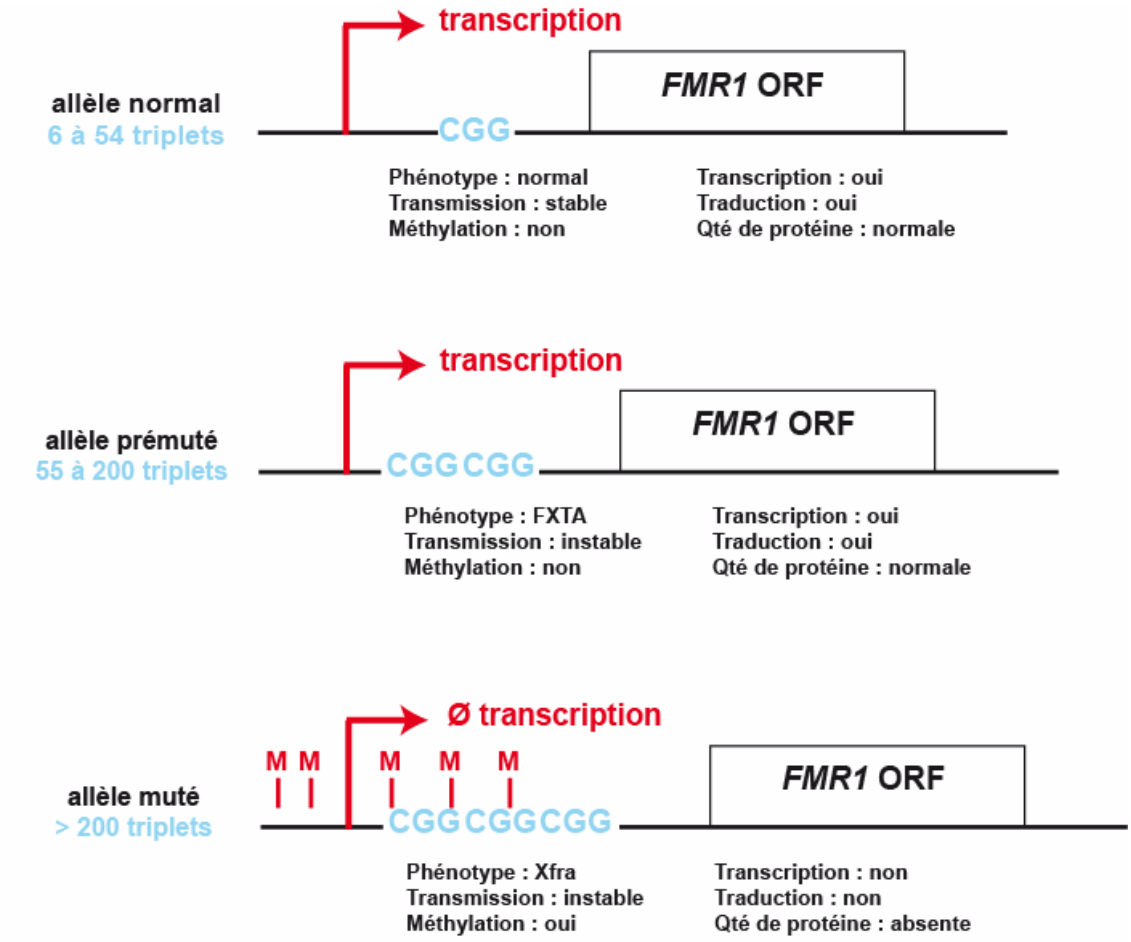


Figure 28 : Classification des allèles de *FMR1* en fonction de la longueur de la série de triplets *CGG*

Représentation schématique de l'allèle normal et des allèles prémutés et mutés résultant de l'expansion de la série *CGG*. Chez les individus sains (allèle normal), le nombre de triplets *CGG* varie de 6 à 54. Les allèles prémutés composent la seconde catégorie. Leurs répétitions sont constituées de 55 à environ 200 triplets. La dénomination "prémutation" vient du fait que ces allèles précèdent l'apparition des mutations complètes. Les mutations complètes sont des répétitions dont la longueur excède 200-230 triplets. Ce qui caractérise particulièrement la mutation complète, hormis la longueur de la séquence additionnelle, est la présence d'une hyperméthylation des répétitions ainsi que de l'îlot CpG tous deux situés dans la région 5' du gène *FMR1*. Abrévations : M : méthylation ; FXTA : syndrome d'ataxie à tremblement liée à l'X fragile ; Xfra: syndrome de l'X fragile ; ORF : phase ouverte de lecture. D'après Oberle et al, 1991 ; Verkerk et al, 1991.

Deux types de défauts ont été observés dans le cerveau des patients atteints du syndrome de l'X fragile et dans un modèle de souris invalidé pour le gène *FMR1* (Hinton et al, 1991 ; Consortium TD-BFX (1994) : la présence d'épines dendritiques anormalement fines et tortueuses et une augmentation de la densité des épines le long des dendrites (pour revue, Bagni & Greenough, 2005). Les épines dendritiques étant les points de contact au niveau des synapses, un défaut dans les connexions et dans la plasticité synaptique pourrait être à l'origine du syndrome de l'X fragile (pour revue, Ronesi & Huber, 2008). De tels défauts dans la structure et/ou le nombre des épines dendritiques ont d'ailleurs été observés dans le cerveau de patients atteints d'autres formes de retards mentaux, et notamment dans le cas des syndromes de Down, de Patau et de Rett (Kaufmann & Moser, 2000). Ces anomalies pourraient donc être un dénominateur commun à la survenue de déficiences intellectuelles.

2/ Le gène FMR1

2.1/ Caractéristiques générales

Le gène *FMR1*, localisé au locus FRAXA (*FRAgile chromosome X site A*) en position Xq27.3, est formé de plusieurs exons dont le premier contient le motif CGG(n) (Krawczun et al, 1985). Ce gène est précédé en 5' par un « ilôt CpG » normalement non méthylé sur le chromosome X de l'homme et méthylé uniquement sur l'X inactivé de la femme. Le gène *FMR1* comporte 17 exons et s'étend sur 38 kb au niveau de la région Xq27.3 (Eichler et al, 1993 ; Eichler et al, 1994) ***(Figure 29)***.

2.2/ L'épissage du gène FMR1

Chez l'humain, le transcrit primaire du gène *FMR1* a une longueur observée de 4,4 kb. Il contient une région 5'UTR (*Untranslated Region*) non-traduite d'environ 200 pb (variable selon le nombre de triplets), une région codante de 1,9 kb et une région 3' UTR non-traduite de 1,8 kb (Verkerk et al, 1991 ; Eichler et al, 1993). Le transcrit primaire peut subir un épissage alternatif qui modifie l'utilisation des exons 12, 14, 15, 16 et 17 (Ashley et al, 1993b ; Eichler et al, 1993 ; Verkerk et al, 1993 ; Sittler et al, 1996). Ainsi, le

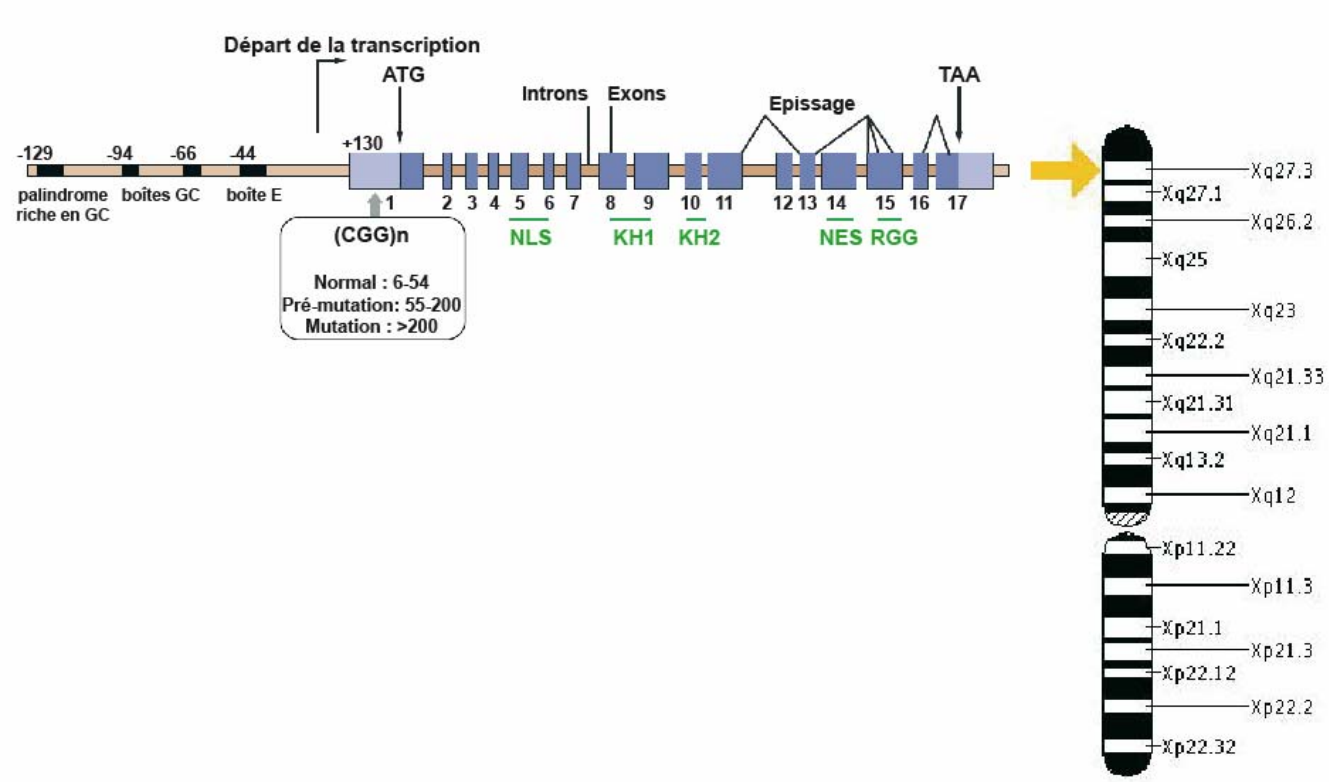


Figure 29 : Organisation du gène *FMR1* humain

Représentation schématique de l'organisation du gène *FMR1.* Le gène *FMR1* comporte 17 exons représentés par des rectangles bleus. Les répétitions *CGG* sont contenues dans la région non-traduite de l'exon 1. Les régions codant pour les principaux domaines fonctionnels sont indiquées en vert. NLS : Signal de Localisation Nucléaire ; KH1/KH2 : K Homology 1/2; NES : Signal d'Export Nucléaire ; RGG : boîte arginine-glycine-glycine. Adapté de la revue, Penagarikano et al, 2007.

nombre d'ARN messagers distincts possibles s'élève à 48. Vingt-quatre de ces messagers ont été détectés dans des extraits cellulaires par RT-PCR mais rien ne prouve qu'ils soient traduits en protéines ***(Figure 30)*** (Ashley et al, 1993b ; Eichler et al, 1993 ; Verkerk et al, 1993). L'épissage de l'exon 12 et les différents sites accepteurs ne modifient pas le cadre de lecture contrairement à l'épissage de l'exon 14 qui génère une nouvelle extrémité carboxy-terminale (Ashley et al, 1993b ; Sittler et al, 1996). L'abondance des différents ARNm, varie selon les tissus mais aucun d'eux n'est spécifique à un tissu particulier (Verkerk et al, 1993). FMRP désigne en réalité l'ensemble des isoformes résultant de la traduction des différents ARNm produits par épissage alternatif du gène *FMR1* (Verkerk et al, 1993). Leur poids moléculaire est compris entre 70 et 80 kD. L'isoforme la plus longue, codée par l'ensemble des exons, comporte 632 acides aminés (iso1). L'isoforme 7, la plus fréquente correspond à l'isoforme 1 dépourvue de l'exon 12 (iso7) (Sittler et al, 1996).

3/ Le syndrome de l'X fragile et la protéine FMRP

Le syndrome de l'X fragile résulte, dans la majorité des cas, de l'absence d'expression du gène *FMR1* (Pieretti et al, 1991 et pour revues, Bardoni & Mandel, 2002 ; O'Donnell & Warren, 2002) et dans certains cas, de délétions dans le gène (Gedeon et al, 1992 ; Wohrle et al, 1992 et pour revue, Coffee et al, 2008). D'un point de vue moléculaire, la pathologie résulte donc, en général, de l'absence de la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) codée par ce gène (Pieretti et al, 1991 ; De Boulle et al, 1993). Une forme sévère de l'X fragile est associée à une mutation ponctuelle faux sens changeant une isoleucine très conservée en une asparagine (I304N) (De Boulle et al, 1993). Chez l'adulte, la protéine FMRP est détectée presque dans tous les tissus, mais à des degrés très différents, avec une expression préférentielle dans le cerveau et les testicules (Devys et al, 1993). En revanche, elle n'a été retrouvée ni dans le cœur, ni dans le muscle (Devys et al, 1993). Dans les cellules, la protéine FMRP est majoritairement cytoplasmique ; seulement 5% sont localisés dans le noyau (Devys et al, 1993 ; Verheij et al, 1993). A noter par contre, que l'isoforme sans l'exon 14 se localise uniquement dans le noyau (Sittler et al, 1996).

A/

	Utilisation du site accepteur n°1 de l'exon 17		Sans exon 12 Utilisation du site accepteur n°1 de l'exon 17		Utilisation du site accepteur n°2 de l'exon 17		Sans exon 12 Utilisation du site accepteur n°2 de l'exon 17	
a	Iso 1	71,1	Iso7	68,9	Iso13	69,1	Iso17	66,9
b	Iso2	69,9	Iso8	67,7	Iso14	67,9	Iso18	65,7
c	Iso3	68,4	Iso9	66,2	Iso15	66,4	Iso19	64,2
Δ14a	Iso4	50,9	Iso10	48,7	Iso4		Iso10	
Δ14b	Iso5	49,5	Iso11	47,3	Iso5		Iso11	
Δ14c	Iso6	61,0	Iso12	58,8	Iso16	59,0	Iso20	56,8

B/

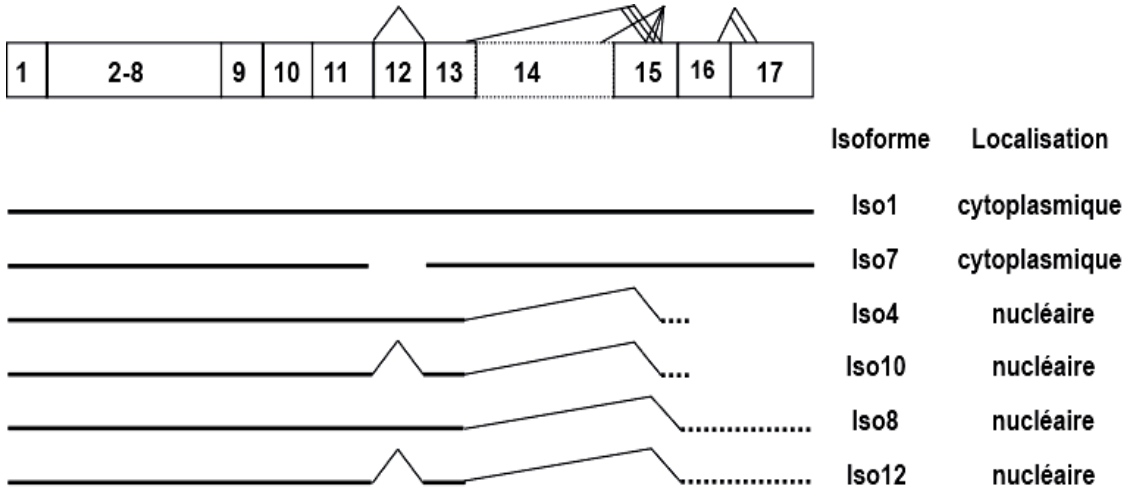


Figure 30 : Isoformes de FMRP

A/ Description des différentes isoformes putatives de FMRP et de leur masse moléculaire (en kD). a, b, c : sites accepteurs 1, 2 et 3 de l'exon 15 ; Δ14 : délétion de l'exon 14. **B/** Structure et localisation de quelques isoformes putatives de FMRP, dont l'isoforme 7 majoritaire. Adapté de Sittler et al, 1996.

Cette différence s'explique par la présence d'un signal d'export cytoplasmique ou NES (*Nuclear Export Signal*) dans l'exon 14 (aa 425-442) ***(Figure 29)*** (Eberhart et al, 1996). La protéine FMRP possède également un signal de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear Localisation Signal) (aa 111-152) (Figure 29) (Eberhart et al, 1996). La présence simultanée d'un NLS et d'un NES suggère que la protéine FMRP fasse la navette entre le noyau et le cytoplasme. La protéine FMRP peut aussi être localisée dans le nucléole car elle contient un signal de localisation nucléolaire à son extrémité N-terminale (Willemsen et al, 1996 ; Ramos et al, 2006).

4/ Les gènes homologues FXR1/FXR2

Le gène *FMR1* appartient à une petite famille de gènes qui inclue les gènes *FXR1* et *FXR2* (*Fragile X Related 1 et 2)* (pour revues, Khandjian, 1999 ; Bardoni & Mandel, 2002). Tous deux sont des gènes autosomiques localisés, respectivement, sur le chromosome 3 en position 3q28 et sur le chromosome 17 en position 17p13.1 (Coy et al, 1995 ; Zhang et al, 1995 ; Wilgenbus et al, 1996). Les gène *FMR1, FXR1* et *FXR2* sont bien conservés durant l'évolution. Des orthologues de ces 3 gènes sont présents chez les mammifères et le poisson zèbre (Ashley et al, 1993a ; Price et al, 1996 ; Wan et al, 2000 ; van 't Padje et al, 2005). *Xenopus laevis* contient, également, deux orthologues : *xFmrp* et *xFrx1* (Siomi et al, 1995 ; Blonden et al, 2005). Aucun orthologue n'a, à ce jour, été clairement mis en évidence chez le nématode *C. elegans* (Shtang et al, 1999). Par contre, un orthologue du gène *FMR1* a été découvert chez *Hydractinia echinata* (*yFMR1*), qui fait partie de l'embranchement des Cnidaires, l'un des embranchements les plus primitifs des Métazoaires (Guduric-Fuchs et al, 2004). Chez la drosophile, l'unique gène *dFMR1* serait l'ancêtre commun des trois membres de cette famille de protéines.

Les gènes *FXR1* et *FXR2* codent respectivement les protéines FXR1P et FXR2P (*Fragile X Related 1 et 2 Protein).* Comme la protéine FMRP, les protéines FXR1P et FXR2P sont détectées dans presque tous les tissus (Devys et al, 1993). Toutefois, la protéine FXR1P est plus spécifique car elle est la seule présente dans les muscles et dans le coeur (Coy et al, 1995 ; Khandjian et al, 1998). Comme FMRP, les protéines FXR1P et FXR2P sont principalement cytoplasmiques mais elles ont également été observées dans le nucléole

(Siomi et al, 1995 ; Zhang et al, 1995 ; Kirkpatrick et al, 1999 ; Tamanini et al, 2000). Bien que l'inactivation du gène *FMR1* soit la cause du syndrome de l'X fragile, aucune pathologie connue chez l'humain n'a été caractérisée par l'absence d'expression des gènes *FXR1* ou *FXR2*. On ne sait pas non plus, pour l'instant, si ces deux gènes peuvent compenser l'absence d'expression du gène *FMR1* chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (pour revue, Davidovic et al, 2006).

II/ FMRP : une protéine de liaison aux ARN

1/ Les domaines fonctionnels de la protéine FMRP

1.1/ Les domaines de liaison aux ARN

La protéine FMRP et ses homologues FXR1P et FXR2P qui sont structuralement très similaires et qui montrent un haut degré d'homologie de séquence (86% et 70% respectivement) possèdent quatre motifs de liaison aux ARN : deux domaines KH situés au centre de la protéine (KH1 = a.a. 212-266 et KH2 = a.a. 285-329) (Ashley et al, 1993a ; Siomi et al, 1993 ; Zhang et al, 1995 ; Wan et al, 2000), une boîte RGG et un domaine NDF dans la région N-terminale ***(Figure 31)*** (pour revues, Khandjian, 1999 ; Bardoni & Mandel, 2002 ; Bardoni et al, 2006 ; Penagarikano et al, 2007). L'importance fonctionnelle des domaines KH a été confirmée par l'identification de la mutation I304N causant un phénotype X fragile très sévère (De Boulle et al, 1993). La boîte RGG de la protéine FMRP (a.a. 527-552) est très importante pour la liaison à l'ARN car il a été montré que la protéine FMRP dont la boîte RGG est tronquée, mais dont les deux domaines KH demeurent intacts, ne possède plus d'affinité pour certains ARN (Siomi et al, 1993 ; Brown et al, 1998). C'est le cas pour l'isoforme ne contenant pas la région codée par l'exon 14 et comportant une région carboxy-terminale différente (Brown et al, 1998). Le motif NDF (a.a 1-134) situé à l'extrémité N-terminale de la protéine contient un motif hélice-boucle-hélice et ressemble à un domaine Tudor. Il est également capable de lier les ARN (Adinolfi et al, 2003 ; Ramos et al, 2006).

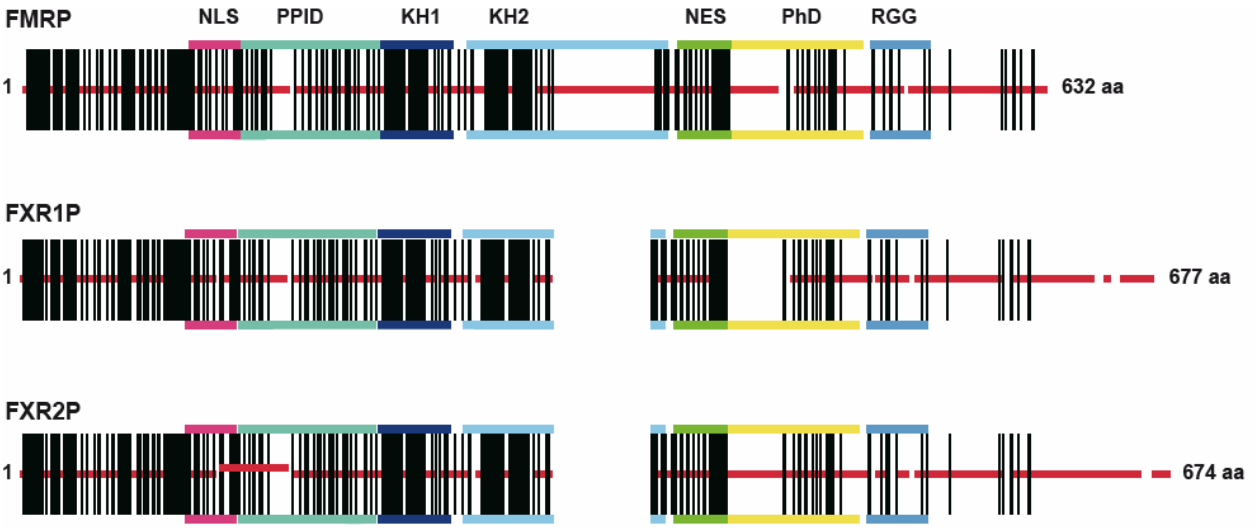


Figure 31 : Comparaison structurale des membres de la famille des FXR

FMRP, la protéine codée par le gene *FMR1*, est l'archetype de la famille des protéines de liaison aux ARN ; les protéines FXR1P et FXR2P sont, respectivement, codées par les gènes *FXR1* et *FXR2*. Les barres noires verticales indiquent les acides aminés identiques dans les trois protéines ; les lignes horizontales rouges montrent les régions où les acides aminés divergent dans les protéines FXR1P et FXR2P par comparaison avec la protéine FMRP. Les domaines KH (KH1 et KH2) et la boîte RGG, qui sont des motifs retrouvés dans beaucoup de protéines de liaison aux ARN, ainsi que les signaux de localisation et d'export nucléaire (NLS and NES), sont conservés dans les trois protéines. Le domaine de phosphorylation (PhD) contient plusieurs acides aminés serine qui peuvent être phosphorylés. Cette modification post-transductionnelle peut moduler les propriétés de ces protéines. Le domaine d'interaction protéine-protéine (PPID) est également indiqué. D'après la revue, Bardoni et al, 2006.

1.2/ Les domaines d'homo et d'hétérodimérisation

Les protéine FMRP, FXR1P et FXR2P sont capables de s'homodimériser ainsi que de s'hétérodimériser (Zhang et al, 1995 ; Siomi et al, 1996 ; Tamanini et al, 1999 ; Adinolfi et al, 2003). Par contre, la protéine FMRP mutée (I304N) peut s'hétérodimériser avec ses homologues mais elle est incapable de s'homodimériser (Laggerbauer et al, 2001). Les interactions entre les protéines FMRP, FXR1P et FXR2P sont dépendantes d'un domaine *coiled-coil* présent dans l'exon 7 (Zhang et al, 1995 ; Siomi et al, 1996). Ce domaine est également impliqué dans l'homodimérisation de la protéine FMRP (Siomi et al, 1996). Le domaine KH2 et le domaine NDF ont également été proposés intervenir dans l'homodimérisation de la protéine FMRP (Laggerbauer et al, 2001 ; Adinolfi et al, 2003).

2/ Les motifs de liaison à l'ARN

Comme le suggérait l'existence des motifs KH et RGG, FMRP est en mesure de lier des homopolymères d'ARN *in vitro*, avec une forte affinité pour les séquences polyG et polyU, mais avec une plus faible affinité pour les séquences polyA et polyC (Ashley et al, 1993a ; Siomi et al, 1993 ; Siomi et al, 1994 ; Brown et al, 1998 ; Adinolfi et al, 1999). La mutation I304N altère la capacité d'interaction de FMRP avec ces homopolymères à hautes concentrations en sels (Siomi et al, 1994), mais ne semble pas affecter cette propriété en conditions physiologiques de salinité (Brown et al, 1998).

FMRP se lie spécifiquement, *in vitro*, et avec une forte affinité à une structure ARN particulière, connue sous le nom de G-quartet ou quartet de guanines (Darnell et al, 2001 ; Schaeffer et al, 2001). Cette liaison dépend du domaine RGG de la protéine ***(Figure 31)*** (Darnell et al, 2001). Les G-quartets sont des structures tridimensionnelles constituées par la superposition de quatre couches planes de quatre purines ***(Figure 32 A/)***. L'association des bases sous forme de quadruplex dépend de la formation de liaisons hydrogène de type Watson/Crick et de type Hoogsteen (pour revue, Schaeffer et al, 2003). Ces structures sont stabilisées par l'insertion de cations monovalent tels que le potassium, mais déstabilisées par les cations comme le sodium ou le lithium (Schaeffer et al, 2001). L'application de la technique SELEX à des formes tronquées de la protéine FMRP ne contenant que les domaines

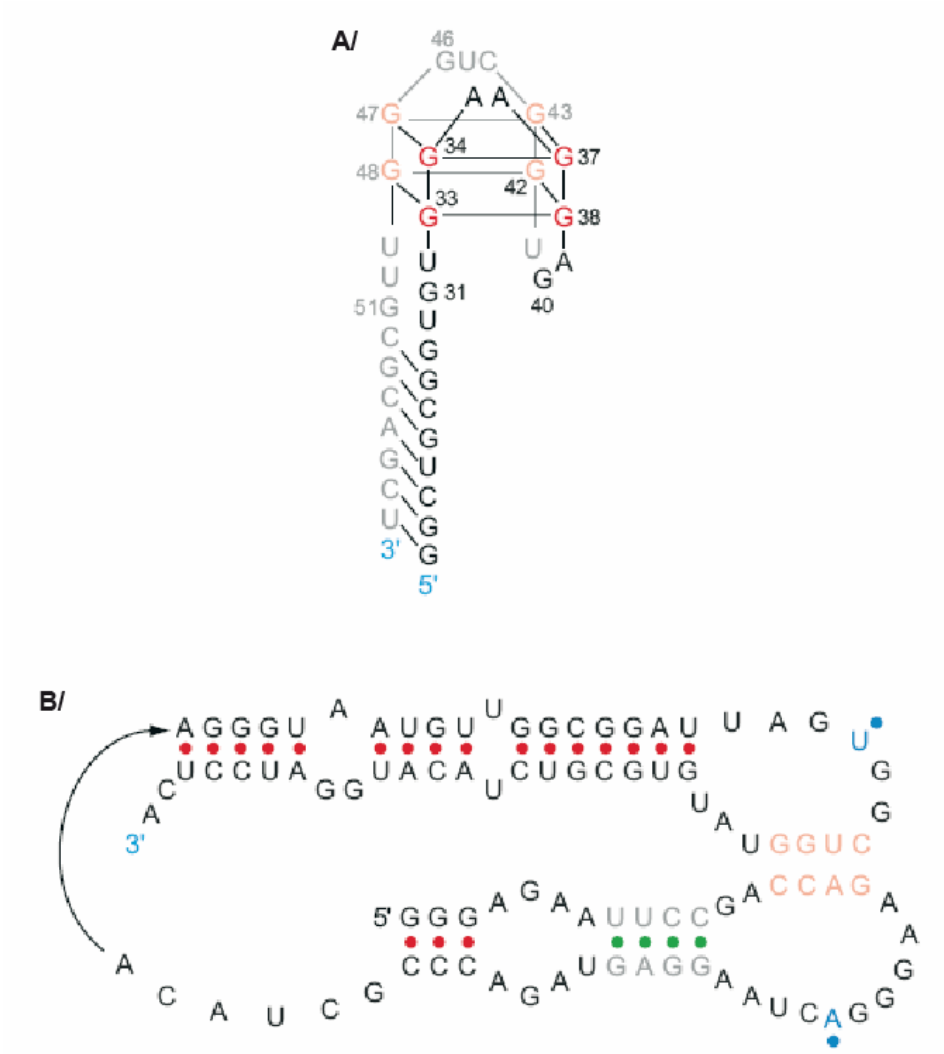


Figure 32 : Structure des quartets de guanines et du « kissing complex »

A/ Représentation schématique d'un quartet de guanines. Dans les quartets de guanines, 4 guanines interagissent entre elles par des ponts hydrogène et forment un arrangement symétrique ayant une conformation planaire (Schaeffer et al, 2001). ***B/*** Structure du kissing complex formé par l'association de deux structures tige-boucle réunies par une interaction entre leurs boucles terminales (Darnell et al, 2005). D'après la revue Penagarikano et al, 2007.

KH a permis d'identifier, *in vitro*, un nouveau type d'interaction possible de la protéine avec l'ARN : une séquence formant une structure en « kissing complex » ***(Figure 32 B/)*** (Darnell et al, 2005). Ce complexe tridimensionnel est formé par l'association de deux structures de type tige-boucle réunies par une charnière simple brin. Le domaine KH2 de la protéine FMRP est nécessaire et suffisant à l'établissement de cette interaction. En effet, la forme mutante I304N de FMRP ne peut s'associer aux ARN via cette structure, alors qu'elle est reconnue par une forme tronquée de FMRP restreinte au domaine KH2 (Darnell et al, 2005). Le phénotype sévère du patient présentant la mutation I304N pourrait donc provenir notamment de l'incapacité de la forme mutée de FMRP à s'associer à des cibles ARN présentant un « kissing complex », attestant alors de l'importance fonctionnelle de cette structure. Cependant, la présence d'une telle structure dans les ARNm liés à la protéine FMRP, *in vivo*, reste encore à démontrer.

3/ Les cibles ARN de la protéine

Des expériences réalisées, *in vitro*, montre que la protéine FMRP se lie à environ 4% des ARNm de cerveaux foetaux humains. Sa fixation à des ARNm, *in vivo* a également été mise en évidence (Ashley et al, 1993a ; Siomi et al, 1993 ; Corbin et al, 1997 ; Feng et al, 1997 ; Ceman et al, 1999; Schaeffer et al, 2001; Brown et al, 2001 ; Darnell et al, 2001 ; Chen et al, 2003 ; Miyashiro et al, 2003). Les ARNm de cerveaux capables d'interagir avec FMRP contiennent soit des structures en G-quartets, soit des séquences riches en U (Brown et al, 2001 ; Darnell et al, 2001 ; Schaeffer et al, 2001 ; Chen et al, 2003 ; Dolzhanskaya et al, 2003). La protéine FMRP s'associe également à son propre ARNm, au niveau de la partie 3'UTR qui contient un G-quartet ce qui module vraisemblablement l'épissage alternatif de l'ARNm (Ashley et al, 1993a ; Brown et al, 1998 ; Schaeffer et al, 2001 ; Didiot et al, 2008). L'ensemble de ces données suggère que la protéine FMRP puisse se lier de manière globale aux séquences ribonucléotidiques, mais possède un degré de sélectivité permettant son association préférentielle à certains ARNm. Nous verrons également dans le prochain chapitre que la protéine FMRP pourrait se lier de manière indirecte à certains de ces ARNm cibles.

Pour identifier les ARNm associés à la protéine FMRP, plusieurs stratégies ont été utilisées. Brown et al. (2001) ont utilisé une technique qui consiste, d'abord à immunoprécipiter spécifiquement les particules messagères contenant la protéine FMRP puis à identifier les ARNm co-immunoprécipités en utilisant des micropuces à ADN. Cette analyse a permis l'identification de 432 ARNm candidats dans des extraits de cerveaux de souris (Brown et al, 2001). Une autre méthode, basée sur l'amplification d'ARNm par des oligonucléotides liés de manière covalente à l'anticorps dirigé contre FMRP, appelée APRA (*Antibody-Positionned RNA Amplification*) a permis la mise en évidence sur macropuces de 81 autres ARNm cibles neuronaux, dont 60% seraient directement associés à la protéine FMRP (Miyashiro et al, 2003). Plus récemment, une autre méthode utilisant un système de triple-hybride a été employée pour identifier les ARNm associés à FMRP (Zou et al, 2007). Cependant, si ces analyses ont permis de vérifier l'existence d'une interaction entre les ARNm et la protéine FMRP *in vivo*, l'existence d'une interaction spécifique avec la plupart des ARNm candidats identifiés reste à démontrer.

4/ FMRP et les granules à ARN dans les neurones

Dans la première partie de cette introduction, nous avons déjà décrit les granules à ARN dans lesquels la protéine FMRP a été identifiée ***(Tableau V, page 76 et 77)*** (cf. 1ère partie, chapitre IV, paragraphe *2.1.1/ Le transport des ARN et le mécanisme de traduction localisée*). Exprimée transitoirement dans des cultures primaires de neurones, la protéine chimérique FMRP-GFP s'accumule préférentiellement dans les mRNP du corps cellulaire. De plus, une population mineure et distincte des mRNP, contenant FMRP, est détectable sous forme de granules dendritiques mais également dans les axones (Feng et al, 1997 ; Weiler et al, 1997 ; Ohashi et al, 2002 ; De Diego Otero et al, 2002 ; Miyashiro et al, 2003 ; Antar et al, 2004 ; Antar et al, 2005 ; Antar et al, 2006 ; Ferrari et al, 2007). Les deux autres membres de la famille des FXR se trouvent aussi dans ces granules ***(Tableau V)*** (Kanai et al, 2004 ; Brendel et al, 2004 ; Villace et al, 2004 ; Elvira et al, 2006). Le mouvement de ces granules est bidirectionnel à petite échelle, mais globalement unidirectionnel et antérograde sur des distances plus longues. La vitesse moyenne de ces complexes RNP le long des prolongements neuronaux est inférieure à 0,2 μm/s (De Diego Otero et al, 2002 ; Davidovic et al, 2007).

Enfin, plusieurs études montrent que le déplacement de ces granules dépendrait de l'intégrité du réseau de microtubules (De Diego Otero et al, 2002 ; Antar et al, 2005).

III/ Principaux interactant de la protéine FMRP

En plus des protéines associées à la protéine FMRP, au sein des granules à ARN ***(Tableau V)***, la protéine FMRP peut interagir avec une large variété d'autres protéines de manière directe ou indirecte ***(Tableau VI)***. La plupart de ces interactant sont, comme la protéine FMRP, des protéines de liaison aux ARN.

IV/ Fonctions de la protéine FMRP

Par ses propriétés de liaison à l'ARN, la protéine FMRP pourrait être impliquée dans le métabolisme de l'ARN. De plus, la présence d'un signal d'export cytoplasmique et d'un signal de localisation nucléaire suggère qu'elle pourrait être impliquée dans le transport d'ARNm du noyau vers le cytoplasme. Enfin, sa présence dans les granules de transport des ARNm suggère un rôle possible dans la régulation de la traduction de certains ARNm (pour revues, Bagni & Greenough, 2005 ; Davidovic et al, 2006 ; Zalfa et al, 2006 ; Bardoni et al, 2006).

1/ FMRP et régulation de la traduction

La protéine FMRP est associée avec les polyribosomes en traduction active mais jamais avec les ribosomes seuls contrairement à ce que laissaient croire les premières études basées sur le fractionnement en gradient de sucrose (Khandjian et al, 1996 ; Siomi et al, 1996 ; Tamanini et al, 1996 ; Corbin et al, 1997 ; Feng et al, 1997). Le traitement des polyribosomes par la RNase a démontré que l'association de la protéine FMRP aux polyribosomes se faisait via une interaction avec l'ARN ou avec une protéine liant

Partenaires de FMRP	Localisation cellulaire	Fixation aux ARN	Domaines d'interaction de FMRP	Fonctions de la protéine partenaire	Réf.
FXR1P	cytoplasme	+	Exon 7, aa 173-217	Régulation de la traduction ?	(Siomi et al, 1995)
FXR2P	cytoplasme	+	Exon 7, aa 173-217	Régulation de la traduction ?	(Zhang et al, 1995)
82-FIP	cytoplasmique, nucléaire	+	Exon 4-5, aa 66-134	Transport des ARNm ?	(Bardoni et al, 2003a)
NUFIP	nucléaire	+	Exon 4-5, aa 66-134	Transport des ARNm ?	(Bardoni et al, 1999 ; Bardoni et al, 2003b ; Schenck et al, 2003)
CYFIP1, CYFIP2	cytoplasme	-	Exon 7, aa 173-217	Remodelage du cytosquelette par la voie Rho/Rac GTPase	(Wan et al, 2000 ; Schenck et al, 2001)
Ran-BPM	nucléo cytoplasmique	-	aa 419-632	Trafic nucléaire, migration cellulaire, régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs stéroïdiens	(Menon et al, 2004)
MSP58 (*microspherule protein 58*)	nucléo cytoplasmique	+	aa 490-526 (domaine de phosphorylation)	Facteur de transcription nucléolaire ? Biogenèse des RNP ? Régulation de la traduction ?	(Davidovic et al, 2006)
KIF3C	compartiment somatodendritiques des neurones	+	Non-connue	Protéine motrice, kinésine neurospécifique	(Davidovic et al, 2007)
SMN	cytoplasmique, nucléaire	+	aa 470-526	Biogenèse des UsnRNPs et épissage des ARN pré-messagers, régulation de la traduction ? Transport des ARNm ?	(Piazzon et al, 2008)
Lgl	soma et neurites en développement	**?**	Non-connue	Transport des ARNm ?	(Zarnescu et al, 2005)

Tableau VI : Les partenaires protéiques de la protéine FMRP

D'après la revue, Bardoni et al, 2006.

l'ARN (Siomi et al, 1996 ; Tamanini et al, 1996). FMRP est associée avec les polyribosomes dans tous les types cellulaires, dont les neurones (Eberhart et al, 1996 ; Khandjian et al, 1996 ; Corbin et al, 1997 ; Feng et al, 1997 ; Weiler et al, 1997 ; Ceman et al, 2003 ; Khandjian et al, 2004 ; Stefani et al, 2004 ; Wang et al, 2004 ; Antar et al, 2004 ; Davidovic et al, 2005 ; Ivanyi-Nagy et al, 2005). La forme mutante (I304N) est incapable de s'incorporer aux polyribosomes démontrant le rôle du domaine KH2 et l'importance de l'interaction de la protéine FMRP avec des ARN (Feng et al, 1997).

L'association de la protéine FMRP avec les polyribosomes suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans la régulation de la traduction de certains ARNm. Effectivement, FMRP inhibe la traduction d'ARNm injectés dans des oocytes de xénope ou en solution dans des extraits de réticulocytes de lapin (Laggerbauer et al, 2001). Lorsque la protéine FMRP est purifiée après production dans *Escherichia coli*, cet effet inhibiteur est indépendant de la nature de l'ARNm testé, alors qu'il est spécifique de certains ARNm lorsque la protéine est préparée à l'aide de baculovirus (Li et al, 2001 ; Schaeffer et al, 2001). Des modifications post-traductionnelles telles que la méthylation et la phosphorylation pourraient donc restreindre l'action inhibitrice de la protéine FMRP à des cibles ARNm particulières (Siomi et al, 2002 ; Denman, 2002 ; Ceman et al, 2003 ; Denman et al, 2004 ; Dolzhanskaya et al, 2006). En effet, la méthylation comme la phosphorylation de la protéine FMRP joue un rôle important dans sa capacité à interagir avec des ARN *in vitro* (Siomi et al, 2002 ; Denman, 2002 ; Ceman et al, 2003 ; Denman et al, 2004 ; Dolzhanskaya et al, 2006). Le domaine C-terminal de la protéine FMRP serait méthylé *in vitro* et *in vivo*, par les enzymes de type PRMT de classe I (*Protein arginine methyltransferase*) (Denman et al, 2004 ; Stetler et al, 2006 ; Dolzhanskaya et al, 2006) et son domaine N-terminal contient des résidus phosphorylés (Ceman et al, 2003). La protéine FMRP inhibe également la traduction d'ARNm dans des cellules transfectées (Mazroui et al, 2002 ; Wang et al, 2004) et dans le cerveau (Lu et al, 2004 ; Qin et al, 2005).

Une augmentation du niveau de synthèse protéique a récemment été observée dans plusieurs régions du cerveau de souris invalidées pour le gène *Fmr1*, ce qui est en bon accord avec le rôle de la protéine FMRP dans la régulation de la traduction *in vivo* (Qin et al, 2005). En absence de la protéine FMRP, le profil d'association de certains ARNm aux polyribosomes est augmenté, alors qu'il est diminué pour d'autres. Ceci a été observé à la fois

dans des souris invalidées pour le gène *Fmr1* et dans des cellules lymphoblastoïdes dérivées de patients X fragile, en comparaison des résultats observés chez des individus sains (Brown et al, 2001 ; D'Agata et al, 2002). La protéine FMRP pourrait donc, selon l'ARNm cible considéré, empêcher ou, au contraire, promouvoir l'association d'ARNm aux polyribosomes. Si l'on considère que le niveau d'association aux polyribosomes reflète celui de traduction de l'ARNm, FMRP pourrait donc jouer *in vivo* le rôle d'inhibiteur ou d'activateur traductionnel, selon l'ARNm considéré (Brown et al, 2001). Il a également été remarqué que dans le cerveau de souris dont le gène *Fmr1* est délété (KO), plusieurs de ces ARNm ainsi que les protéines correspondantes montrent des changements à la fois de localisation et d'abondance (Miyashiro et al, 2003).

Selon les données actuelles, il semble que la protéine FMRP puisse inhiber la traduction au stade de l'initiation mais également au stade de l'élongation. En effet, les premières données indiquaient que la protéine FMRP interfèrait avec l'initiation de la traduction en empêchant l'assemblage du complexe ribosomal 80S (Laggerbauer et al, 2001). Cependant, comme la protéine se retrouve associée, majoritairement, aux polyribosomes en traduction active où l'on retrouve de multiples unités 80S, des mécanismes impliquant une inhibition de l'élongation de la traduction ont, ensuite, été proposés (Eberhart et al, 1996 ; Khandjian et al, 1996 ; Siomi et al, 1996 ; Tamanini et al, 1996 ; Corbin et al, 1997 ; Feng et al, 1997 ; Ceman et al, 2003). De récents travaux montrent que, dans les neurones, la majorité des protéines FMRP cytoplasmiques, est incorporée dans les polyribosomes indépendamment des microtubules et qu'elle pourrait gouverner l'élongation de la traduction (Wang et al, 2008). Par contre, la fraction de protéines FMRP associées aux microtubules est transportée avec des mRNP dont la traduction est bloquée sans être associée aux polyribosomes (Wang et al, 2008). Au sein de ces granules à ARN, la protéine FMRP pourrait participer à l'inhibition de la traduction au stade de l'initiation.

Plusieurs mécanismes moléculaires de régulation de la traduction par la protéine FMRP ont été proposés. Tout d'abord, il a été démontré que la protéine FMRP pourrait servir de chaperone moléculaire (Gabus et al, 2004 ; Ivanyi-Nagy et al, 2005). La fixation de la protéine FMRP sur ses ARNm cibles favoriserait une conformation stable de l'ARN. Ainsi, une ou un petit nombre de molécules de FMRP ouvrirait la structure de l'ARNm et favoriserait l'initiation de sa traduction. Par ailleurs, un plus grand nombre de

protéines FMRP, de concert avec d'autres protéines, pourrait contribuer à l'empaquetage de l'ARNm, le rendant ainsi inaccessible à l'appareil de traduction (Ivanyi-Nagy et al, 2005). Il a également été proposé que la protéine FMRP intervienne dans la voie de l'ARN interférence (pour revues, Jin et al, 2004a ; Plante & Provost, 2006 ; Plante et al, 2006 ; Qurashi et al, 2007). Un lien entre dFMR1, l'orthologue de FMRP chez la drosophile, et le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) a été observé, puisque dFMR1 fait partie d'un complexe contenant la protéine Argonaute 2 et interagit directement avec l'enzyme Dicer (Caudy et al, 2002 ; Ishizuka et al, 2002). L'association de FMRP au complexe RISC a également été proposée chez les Vertébrés (Jin et al, 2004b ; Lugli et al, 2005). Un autre mécanisme de régulation de la traduction dans lequel la protéine FMRP serait impliquée, implique l'ARN non-codant BC1 et son homologue fonctionnel, chez l'homme, l'ARN BC200 (pour revues, Bagni & Greenough, 2005 ; Bardoni et al, 2006). Ces deux ARN font également partie de mon travail de thèse ; cette hypothèse sera, donc, discutée dans la troisième partie de cette introduction.

2/ FMRP et le transport des ARNm

Bien qu'un rôle direct de la protéine FMRP dans le transport des ARNm n'ait pu être démontré, il a récemment été proposé qu'elle serve de lien entre les granules à ARN et les molécules moteurs. En effet, la protéine KIF3C, une protéine adaptatrice couplant les granules à ARN aux molécules moteurs interagit avec la protéine FMRP et colocalisent au sein des mêmes granules de transport (Davidovic et al, 2007). L'hétérogènéité de composition des granules à ARN ***(Tableau V)*** (cf. 1ère partie, chapitre IV, paragraphe *2.1.1/ Le transport des ARN et le mécanisme de traduction localisée*) laisse supposer que différentes protéines motrices puissent assurer le transport spécifique des granules à ARN contenant la protéine FMRP. Ainsi, l'association sélective des granules à ARN avec des protéines motrices particulières pourrait fournir un mécanime pour cibler certains ARNm aux axones ou aux dendrites (pour revue, Hirokawa & Takemura, 2005).

3/ Régulation de la synthèse protéique dans les neurones

3.1/ Régulation de la synthèse protéique dans les axones

Comme la protéine FMRP est localisée dans les cônes de croissance des axones en développement, elle pourrait réguler la traduction des protéines nécessaires à la croissance et à la mobilité des axones ainsi qu'à la formation des synapses (Antar et al, 2006 ; Ferrari et al, 2007). En effet, les neurones des souris invalidées pour le gène *Fmr1* présentent des cônes de croissance avec un nombre excessif de prolongements. Ces cônes de croissance montrent, également, une diminution de leurs mouvements, qui sont essentiels à l'établissement de connexions avec d'autres neurones (Antar et al, 2006).

3.2/ Régulation de la synthèse protéique au niveau des synapses

Un nombre important d'études suggère une implication de la protéine FMRP dans la régulation de la traduction d'ARNm dans les dendrites, tels que l'ARNm de la protéine MAP1B (*Microtubule-Associated Protein 1B*), PSD-95 (*Postsynaptic Density Protein of 95 kD*), une protéine essentielle à la plasticité synaptique, du facteur d'élongation EF-1α (*Elongation Factor 1 α*), ou encore APP (*Amyeloid Precursor Protein*). Cette régulation est mise en place en réponse à l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate du groupe I (mGluR1 et mGluR5) (Todd et al, 2003 ; Sung et al, 2003 ; Muddashetty et al, 2007 ; Zalfa et al, 2007 ; Westmark & Malter, 2007 ; Davidkova & Carroll, 2007). L'activation de ces récepteurs contribuent à la dépression à long terme ou LTD (cf. 1ère partie, chapitre IV, paragraphe *2.1.1/ Le transport des ARN et le mécanisme de traduction localisée*). La LTD est causée par une diminution de l'expression des récepteurs au glutamate de type AMPA (*acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique*) à la surface des cellules (pour revues, Hall & Ghosh, 2008 ; Hirling, 2008).

En conditions normales, la synthèse de la protéine FMRP et des ARNm qui lui sont associés augmentent localement au niveau synaptique en réponse à différents stimuli activant les mGluR ***(Figure 33)*** (Weiler et al, 1997 ; Todd et al, 2003 ; Antar et al, 2004 ; Ferrari et al, 2007). Après une brève stimulation de la traduction de la protéine FMRP, celle-ci est rapidemment dégradée entraînant probablement la dérépression de ces ARNm cibles (Hou et al, 2006). Il est également possible que la déphosphorylation de la protéine FMRP

cause un changement conformationnel de cette protéine qui pourrait permettre la reprise de la traduction de ces ARNm cibles (Pfeiffer & Huber, 2007 ; Narayanan et al, 2007).

En absence de FMRP, la LTD est augmentée et persiste ***(Figure 33)*** (Hou et al, 2006 ; Nosyreva & Huber, 2006). Une explication serait que l'absence de la protéine FMRP et donc l'absence d'inhibition de la traduction de ses ARNm cibles provoquerait une augmentation du taux de protéines aux synapses stimulant la perte des récepteurs AMPA. En effet, il a été observé une augmentation du taux de synthèse protéique dépendant de l'activation des mGluR en absence de FMRP (Huber et al, 2002 ; Lu et al, 2004 ; Weiler et al, 2004 ; Muddashetty et al, 2007). La protéine FMRP serait également impliquée à la fois dans la traduction et la stabilité de l'ARNm la protéine PSD-95 (Todd et al, 2003 ; Muddashetty et al, 2007 ; Zalfa et al, 2007). Ainsi, l'absence de la protéine FMRP provoquerait une dégradation de l'ARNm et une perte de la protéine PSD-95 essentielle à la régulation de l'expression des récepteurs AMPA à la surface des cellules (Colledge et al, 2003 ; Zalfa et al, 2007).

Ainsi, chez les patients atteints de l'X fragile, l'absence de la protéine FMRP provoquerait la synthèse en continu des protéines normalement activées sous l'influence des récepteurs mGluR. Cette dérégulation dans la synthèse protéique serait à l'origine des changements synaptiques pouvant expliquer les désordres cognitifs observés dans la pathologie.

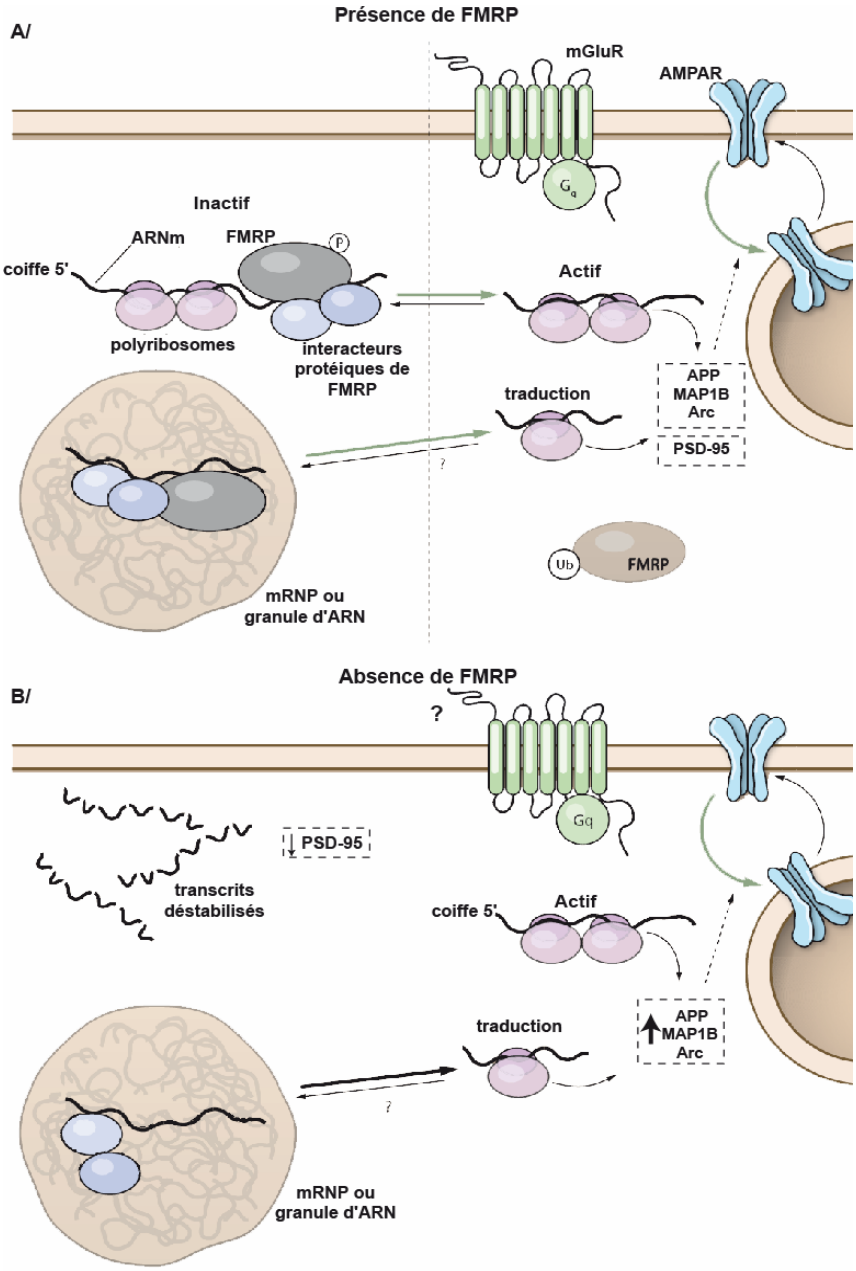


Figure 33 : Implication de la protéine FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : émergence du modèle des récepteurs au glutamate

A/ FMRP aurait un rôle double : elle régulerait la traduction de ses ARNm cibles en réponse à l'activation des récepteurs mGluR et en absence de stimulation elle réprimerait la traduction des ARNm au sein des mRNP ou granules d'ARN. L'activation des récepteurs mGluR permet la traduction des ARNm de FMRP tels que MAP1B, PSD-95 et la stimulation de l'élimination des récepteurs AMPA par endocytose. L'activation de ces récepteurs permettrait l'ubiquitinylation et la dégradation de la protéine FMRP pour permettre la levée de l'inhibition de la traduction (Hou et al, 2006). **B/** L'absence de la protéine FMRP provoquerait la synthèse en continu des protéines normalement activées sous l'influence des récepteurs mGluR. Certains ARNm cibles de FMRP tels que PSD-95 seraient, en outre, déstabilisés. Ces deux phénomènes expliqueraient que la LTD soit augmentée et persiste en induisant un affaiblissement et une modification de la morphologie synaptique. mGluR : récepteur métabotropique au glutamate AMPAR : récepteurs AMPA (*acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique*). D'après la revue, Ronesi & Huber, 2008.

Chapitre III : Les ARN neuronaux BC1 et BC200

I/ Caractéristiques des ARN neuronaux BC1 et BC200

1/ Origine et structure

BC1 (*brain cytoplasmic RNA 1*) et BC200 (*brain cytoplasmic RNA 200-nt*) sont deux ARN non codantn transcrits par l'ARN polymérase III (Sutcliffe et al, 1982 ; Watson & Sutcliffe, 1987). Les gènes de ces deux ARN ont récemment émergé dans l'évolution grâce à des évènements de rétrotransposition indépendants. En effet, l'ARN BC1 résulte d'un évènement de rétrotransposition de l'ARN de transfert alanine ($ARNt^{Ala}$) et a été retrouvé chez tous les rongeurs (pour revue, Brosius, 1999). La similarité de séquences entre l'$ARNt^{Ala}$ et l'ARN BC1 est d'environ 75%. L'ARN BC1 est un petit ARN de 152 nt dont la structure secondaire a été établie par l'emploi de sondes chimiques et enzymatiques (Rozhdestvensky et al, 2001). Cet ARN présente une structure tripartite avec un domaine 5' structuré en une longue tige-boucle de 74 nt contenant trois boucles internes, un domaine central composé d'un domaine polyA simple brin (nt 75 à 131) et finalement d'un domaine 3' formant une tige boucle terminale (nt 132 à 152) ***(Figure 34 A/)*** (Rozhdestvensky et al, 2001). Il est intéressant de remarquer que cet ARN qui est le produit d'un évènement de rétrotransposition de l'$ARNt^{Ala}$ ne présente aucune similarité de structure avec ce dernier. Plus récemment, des paires de bases non canoniques ont été identifiées dans la boucle apicale interne de l'ARN BC1 ***(Figure 34 encart)*** (Muslimov et al, 2006). L'ARN BC200 est issu d'un processus de rétrotransposition d'un élément Alu monomérique, dérivant de l'ARN 7S de la particule SRP (*Signal Recognition Particule*) (cf 4ème partie de l'introduction) et est présent uniquement chez les primates (Martignetti & Brosius, 1993). Quand j'ai débuté mon travail de thèse, la structure de l'ARN BC200 n'était pas connue. Cependant, il avait été proposé que son domaine 5' puisse se replier de manière identique à celui de l'ARN 7S de la particule SRP (Labuda & Zietkiewicz, 1994 et pour revue, Bovia & Strub, 1996). L'ARN BC200 contient comme l'ARN BC1 une région centrale riche en adénosines et un domaine 3' terminal qui lui

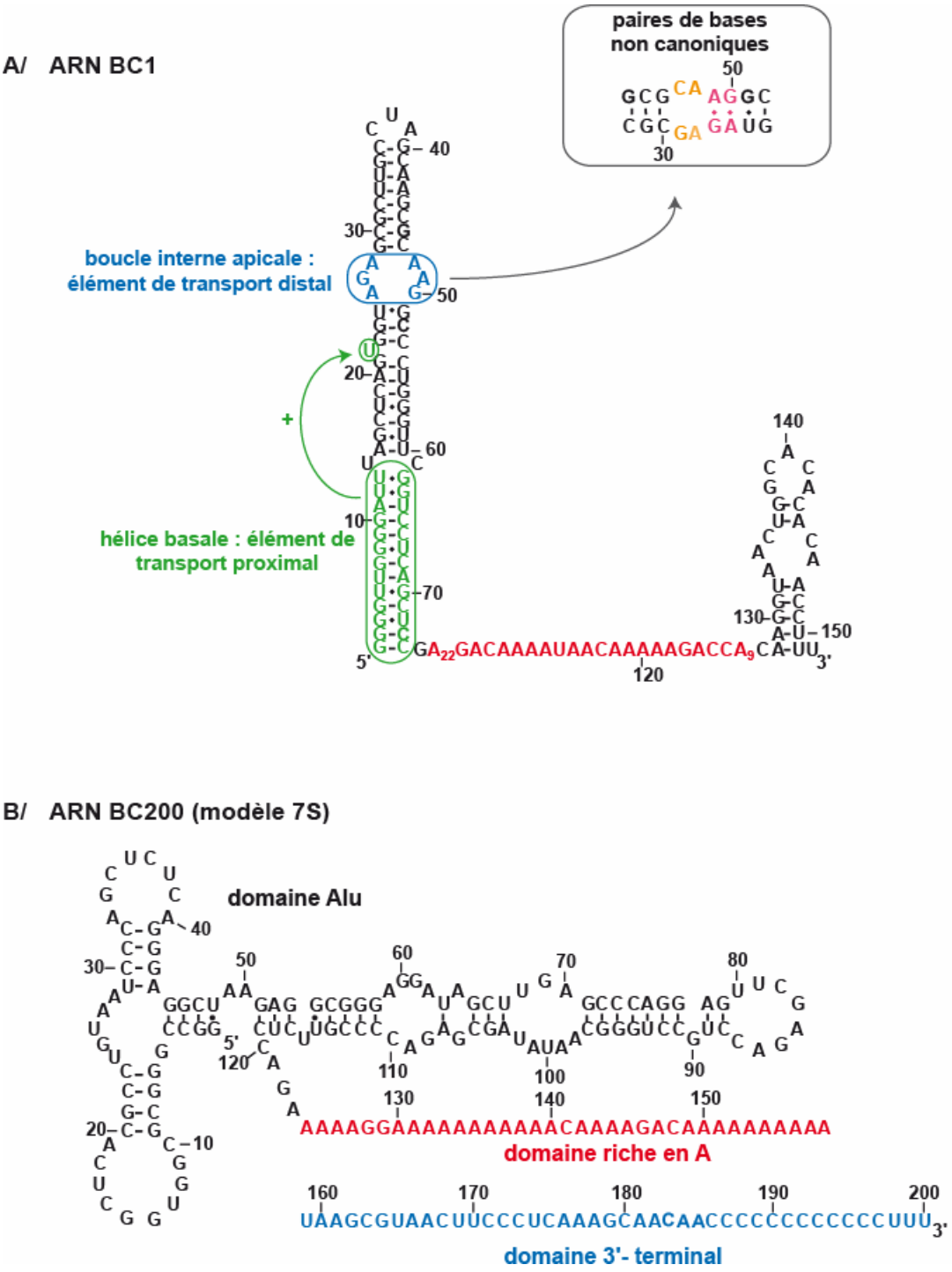


Figure 34 : Structure secondaire de l'ARN BC1 de souris (A) et modèle de structure secondaire de l'ARN BC200 basé sur la structure secondaire de l'ARN 7S (B)

A/ La structure de l'ARN BC1 a été analysée expérimentalement par (Rozhdestvensky et al, 2001). Les éléments nécessaires au transport distal et proximal sont indiqués et l'encart représente les paires de bases non canoniques (Muslimov et al, 2006). **B/** Le modèle de structure secondaire connu de l'ARN BC200, basé sur la structure secondaire de l'ARN 7S, a été proposé par (Labuda & Zietkiewicz, 1994) et (Bovia & Strub, 1996). Les nucléotides en bleu correspondent au domaine 3'-terminal de cet ARN et le domaine Alu est représenté en noir. Le domaine riche en A des ARN BC1 et BC200 est représenté en rouge.

est spécifique ***(Figure 34)***. Les ARN BC1 et BC200 sont considérés comme deux homologues fonctionnels même s'ils ne partagent pas un même pédigree évolutif et présentent très peu d'homologies de séquences. Aucun autre ARN de ce type n'a pu être identifié jusqu'à présent dans d'autres espèces. Des souris, chez lesquelles le gène codant l'ARN BC1 a été délété, sont viables mais présentent des défauts du comportement se manifestant par des capacités d'exploration réduite et une anxiété accrue (Skryabin et al, 2003 ; Lewejohann et al, 2004). Ce résultat indiquerait que l'ARN BC1 n'est pas essentiel à la fonction du cerveau chez la souris, mais pourrait moduler l'activité neuronale.

2/ Les protéines associées aux ARN BC1 et BC200

In vivo, les ARN BC1 et BC200 sont associés à des protéines pour former respectivement une ribonucléoparticule de 10 S (Kobayashi et al, 1991 ; Cheng et al, 1996) et de 11,4 S (Cheng et al, 1997). La composition protéique de ces particules n'est pas connue. Cependant, plusieurs protéines interagissant avec ces ARN ont déjà été identifiées. A l'heure actuelle, on ne sait pas si ces protéines font partie intégrante de ces particules ou si elles interagissent de manière transitoire avec les ARN. Plusieurs protéines sont communes aux deux ARN et d'autres sont spécifiques à l'un ou à l'autre.

2.1/ Les protéines communes aux ARN BC1 et BC200

La **PABP** (*PolyA Binding Protein*) interagit directement *in vitro* et *in vivo* avec les ARN BC1 et BC200. Cette interaction est médiée par l'intermédiaire de la région riche en adénosines (domaine polyA) des ARN BC1/BC200 (Muddashetty et al, 2002 ; West et al, 2002 ; Mullin et al, 2004 ; Kondrashov et al, 2005 ; Wang et al, 2005 ; Wang et al, 2002 ; Khanam et al, 2006). La protéine PABP comporte quatre motifs de reconnaissances à l'ARN appelés RRM (*RNA recognition motif*) (pour revue, Sachs & Varani, 2000). En testant plusieurs combinaisons de RRM, il a été montré que l'affinité des ARN BC1 et BC200 pour la PABP suivait cet ordre : RRM 1+2 > PABP > RRM 3+4 > RRM 2+3 (Khanam et al, 2006 ; Wang et al, 2005 ; Kondrashov et al, 2005).

La protéine **La** interagit également avec les ARN BC1 et BC200 *in vivo* et *in vitro* (Kremerskothen et al, 1998a). Comme c'est le cas pour d'autres transcrits polIII, la protéine La fixe spécifiquement à l'extrémité 3' de l'ARN BC200.

Les ARN BC1 et BC200 s'associent également, *in vitro* et *in vivo*, avec la protéine **Purα** (Ohashi et al, 2000 ; Kobayashi et al, 2000 ; Johnson et al, 2006). L'ARN BC1 contient, en effet, deux sites de fixation putatifs pour les protéines Pur : le premier est situé en amont de la séquence codante de l'ARN (nt -97 à -80) et le deuxième est une séquence riche en guanines (G-rich) dans la partie 5' de l'ARN BC1 (nt 1 à 10) (Ohashi et al, 2000 ; Kobayashi et al, 2000). La protéine Purα est une protéine qui lie les ARN (Bergemann & Johnson, 1992 ; Bergemann et al, 1992), elle est abondante dans les neurones (Osugi et al, 1996) et est retrouvée dans les granules de transport (cf 1ère partie, chapitre IV, paragraphe *2.1.1/ Le transport des ARN et le mécanisme de traduction localisée* et ***tableau V***). L'ARN BC1 interagit également avec l'isoforme **Purβ** (Ohashi et al, 2000). La fixation des protéines Pur est, en outre, inhibée par la présence de la protéine **translin** (Ohashi et al, 2000). En effet, la translin reconnaîtrait le domaine 5' de l'ARN BC1 (Muramatsu et al, 1998 ; Kobayashi et al, 1998). La fixation de ces deux protéines à l'ARN BC1 est donc mutuellement exclusive (Ohashi et al, 2000).

Il a également été proposé que les ARN BC1 et BC200 interagissent, *in vitro*, avec la protéine **FMRP** (cf 2ère partie, chapitre IV, paragraphe *1/ FMRP et régulation de la traduction*) (Zalfa et al, 2003 ; Zalfa et al, 2005). *In vitro*, le domaine N-terminal (aa 1 à 217) de la protéine FMRP est nécessaire et suffisant pour permettre l'interaction avec ces deux ARN (Zalfa et al, 2005). Il a été également montré que la tige boucle en 5' de l'ARN BC1 (nt 1 à 76) est importante pour cette interaction (Zalfa et al, 2005). Son domaine de fixation au sein de l'ARN BC200 reste encore inconnu. L'ARN BC1 colocalise également avec la protéine FMRP dans des neurones hippocampaux (Ferrari et al, 2007). Cependant, cette interaction est aujourd'hui controversée (cf. chapitre II, paragraphe *2/ Contrôle indirect de la traduction en lien avec la protéine FMRP*).

2.2/ Les protéines spécifiques à l'ARN BC1

D'autres protéines interagissent spécifiquement avec l'ARN BC1. En effet, le domaine 5' de l'ARN BC1 fixe, *in vitro*, la protéine **hnRNP-A2** (*heterogeneous nuclear*

RiboNucleoProtein A2)**,** une protéine qui pourrait être importante pour son transport dans les neurones (Muslimov et al, 2006).

L'ARN BC1 interagit également, *in vitro* et de manière directe, avec les facteurs d'initiation de la traduction **eiF4A** et **eiF4B** (Wang et al, 2005 ; Wang et al, 2002 ; Lin et al, 2008). eIF4A est une ARN hélicase nécessaire à l'initiation de la traduction. L'étape d'initiation de la traduction comporte plusieurs étapes dont la première est l'assemblage sur la grande sous-unité du ribosome, des facteurs eIF1A, eIF3 et du complexe eIF2/GTP/Met-tRNA pour former le complexe de pré-initiation 43S ***(Figure 35)***. Puis ce complexe 43S est recruté sur l'ARNm qu'il scanne jusqu'à la rencontre du codon de démarrage de la traduction (codon AUG) où il se forme un second complexe de pré-initiation 48S. Le recrutement de l'ARNm sur le complexe 43S est médié par le groupe de facteurs eIF4. Finalement, après la libération des facteurs d'initiation du complexe 48S, la sous-unité 60S du ribosome se joint au complexe 48S pour former un complexe 80S ***(Figure 35)*** (pour revues, Gingras et al, 1999 ; Pestova & Hellen, 2001 ; Dever, 2002).

2.3/ Les protéines spécifiques à l'ARN BC200

Certaines protéines sont spécifiques à l'ARN BC200. En effet, le domaine Alu de l'ARN BC200 interagit, *in vitro* et *in vivo*, comme l'ARN 7S (cf 4ème partie de cette introduction) avec les protéines **SRP 9 et 14** (Bovia et al, 1997 ; Kremerskothen et al, 1998b ; Khanam et al, 2006). Finalement, l'ARN BC200 interagit, *in vitro* et *in vivo*, avec la protéine **SYNCRIP** (*Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA interacting protein*) également connue sous le nom de hnRNP-Q/R (Duning et al, 2008). Les domaines Alu et poly A de l'ARN BC200 sont nécessaires à cette interaction. SYNCRIP contient 3 domaines de fixation aux ARN de type RRM et plusieurs boîtes riches en arginines et glycines ou boîtes RGG (Burd & Dreyfuss, 1994 ; Nagai et al, 1995 ; Deo et al, 1999 ; Mizutani et al, 2000). En testant plusieurs combinaisons de RRM, il a été montré que les motifs RRM 1+2 étaient les principaux sites de fixation à l'ARN BC200 (Duning et al, 2008). Il est intéressant de remarquer, à nouveau, que l'hnRNP-Q/R comme Purα a été décrite dans les granules de transport et interagit avec la protéine SMN (cf 1ère partie, chapitre IV, paragraphe *2.1.1/ Le transport des ARN et le mécanisme de traduction localisée* et tableau V).

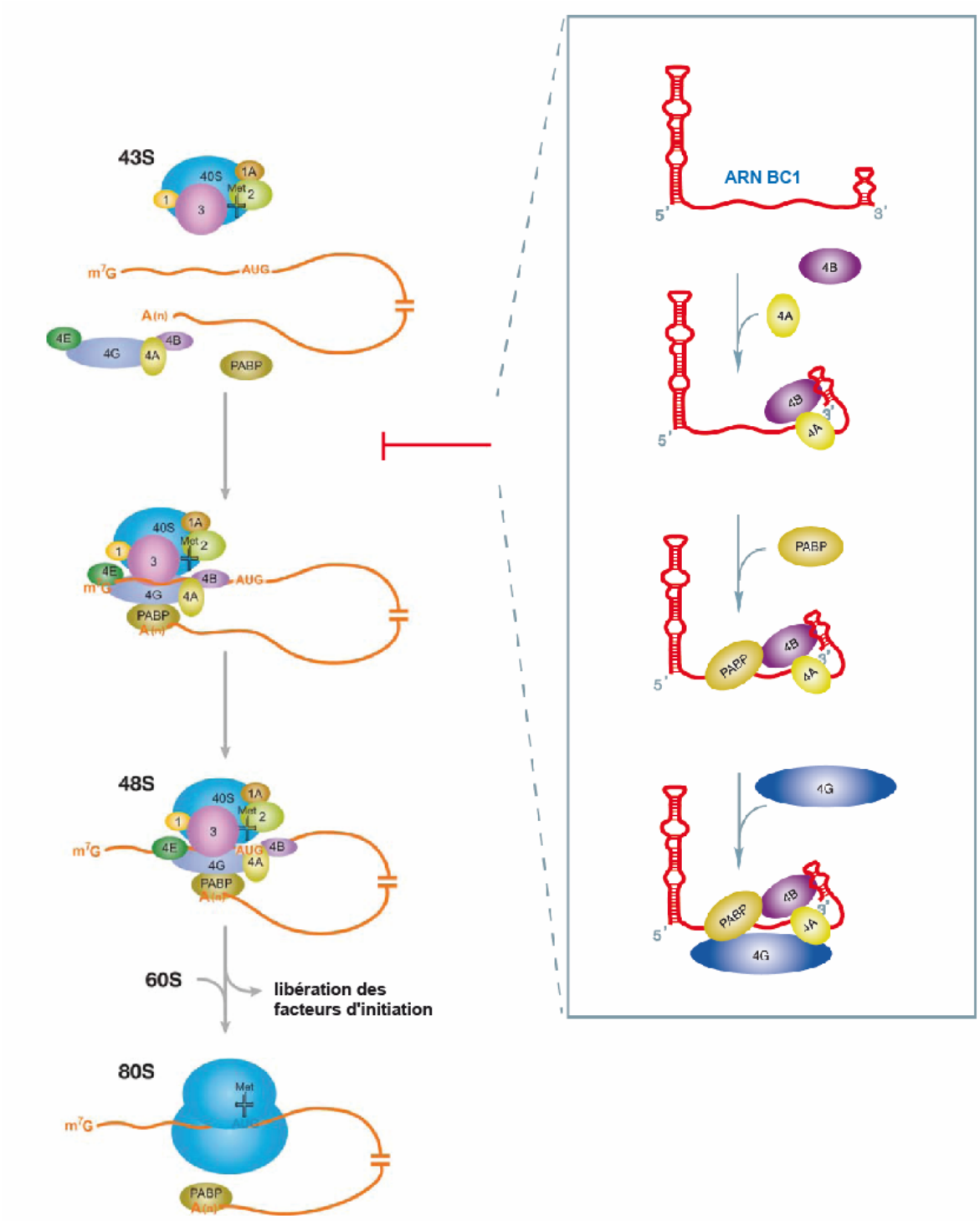


Figure 35 : Schéma de l'interaction du domaine 3' de l'ARN BC1 avec les facteurs eIF4A et eiF4B et la protéine PABP responsable de la répression de l'initiation de la traduction par l'ARN BC1

La fixation de eiF4A et eiF4B sur l'ARN BC1 est coopérative. L'interaction du domaine 3' de l'ARN BC1 avec ces deux facteurs et la protéine PABP empêcherait alors la formation du complexe 48S d'initiation. La structure secondaire de l'ARN BC1 a été proposée par Rozhdestvensky et al, 2001. Par soucis de simplicité, certains facteurs qui font partie du complexe d'initiation ont été ommis (ex : eIF5) du schéma. D'après Lin et al, 2008 et la revue Kindler et al, 2005.

3/ Localisation cellulaire des ARN neuronaux BC1 et BC200

Les ARN BC1/BC200 sont tous les deux spécifiquement exprimés dans les neurones et transportés dans les dendrites (Tiedge et al, 1991 ; Tiedge et al, 1993a). L'ARN BC1 a également été retrouvé dans les axones (Tiedge et al, 1993b ; Muslimov et al, 2002 ; Centonze et al, 2007). Par contre, on ne sait pas si c'est le cas pour l'ARN BC200. Le transport de l'ARN BC1, dans les dendrites, a été particulièrement bien étudié et dépend de son extrémité 5' terminale (Muslimov et al, 1997 ; Muslimov et al, 2002). Cette extrémité contiendrait deux éléments d'adressage aux dendrites (Muslimov et al, 2006). Le premier est nécessaire au transport dans les dendrites à courte échelle appelé transport proximal. Cet élément correspond à l'hélice basale de l'ARN BC1 (nt 1 à 13 appariés aux nt 62 à 74) et au nucléotide U22 non apparié ***(Figure 34)*** (Muslimov et al, 2006). La boucle interne apicale de l'ARN BC1 constitue un second élément, nécessaire au transport dans les dendrites à longue distance ou transport distal ***(Figure 34)*** (Muslimov et al, 2006). Cette boucle interne contiendrait des paires de bases non canoniques capables de lier *in vitro* la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 34)*** (Muslimov et al, 2006). Cette protéine a été initialement impliquée dans le transport de l'ARNm de la MBP (*Myelin Basic Protein*) dans les oligodendrocytes et les neurones (Ainger et al, 1997). Récemment, elle a été impliquée dans le transport d'autres ARNm dans les dendrites (pour revue, Carson & Barbarese, 2005). L'hnRNP-A2 pourrait donc jouer un rôle dans le transport de l'ARN BC1 dans les dendrites. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur le mode de transport de l'ARN BC200.

II/ Rôles des ARN neuronaux BC1 et BC200

1/ Contrôle direct de la traduction par inhibition de l'initiation

Plusieurs données suggèrent que les ARN BC1 et BC200 joueraient un rôle dans le contrôle de l'initiation de la traduction. En effet, par des expériences réalisées dans des réticulocytes de lapin, il a été montré que ces deux ARN inhibent la traduction de nombreux ARNm mais sans aucune spécificité (Wang et al, 2002 ; Kondrashov et al, 2005).

L'injection de l'ARN BC1 dans des oocytes de Xénopes et l'expression des ARN BC1 et BC200 dans des cellules HeLa inhibent également la traduction (Wang et al, 2005 ; Kondrashov et al, 2005). Le domaine poly A semble impliqué dans cette inhibition mais d'autres domaines pourraient également être requis et notamment le domaine Alu de l'ARN BC200 (Kondrashov et al, 2005). Grâce à des expériences réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo*, un modèle de répression de l'initiation de la traduction par l'ARN BC1 a été proposé ***(Figure 35)*** (Wang et al, 2005). L'ARN BC1 entier ou son domaine 3' (poly A : nt 75 à 131 et tige boucle terminale nt 132 à 152) ***(Figure 34)*** inhibe la formation du complexe de pré-initiation 48S (Wang et al, 2002 ; Wang et al, 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, l'ARN BC1 interagit avec les protéines eIF4A, eiF4B et PABP (West et al, 2002 ; Kondrashov et al, 2005 ; Wang et al, 2002 ; Wang et al, 2005 ; Lin et al, 2008). La fixation de ces protéines à l'ARN BC1 n'est pas exclusive (Wang et al, 2005 ; Lin et al, 2008). Ainsi, l'ARN BC1 en interagissant avec ces protéines bloquerait l'initiation de la traduction ***(Figure 35)***. L'ARN BC200 a également la capacité d'interagir avec la protéine PABP et eiF4A (Muddashetty et al, 2002 ; Mullin et al, 2004 ; Kondrashov et al, 2005 ; Khanam et al, 2006 ; Lin et al, 2008),

2/ Contrôle indirect de la traduction en lien avec la protéine FMRP

Nous avons vu que plusieurs résultats suggèrent fortement que la protéine FMRP puisse jouer un rôle essentiel dans le blocage de la traduction (cf. 2ème partie de cette introduction). Or, comme décrit précédemment, les ARN BC1 et BC200 pourraient interagir tous deux avec cette protéine (Zalfa et al, 2003 ; Zalfa et al, 2005). Un modèle a été proposé selon lequel ces deux ARN serviraient d'adaptateurs entre les ARNm et la protéine FMRP. Ainsi, les ARN BC1 et BC200 recruteraient les ARNm cibles de FMRP, par appariements de bases et participeraient ainsi au mécanisme de répression de la synthèse protéique par FMRP ***(Figure 36)*** (Zalfa et al, 2003). En accord cette hypothèse, des régions de complémentarité entre les ARN BC1 et BC200 et certains ARNm dont la synthèse protéique est régulée par la protéine FMRP ont été identifiés. C'est notamment le cas pour les ARNm codant la

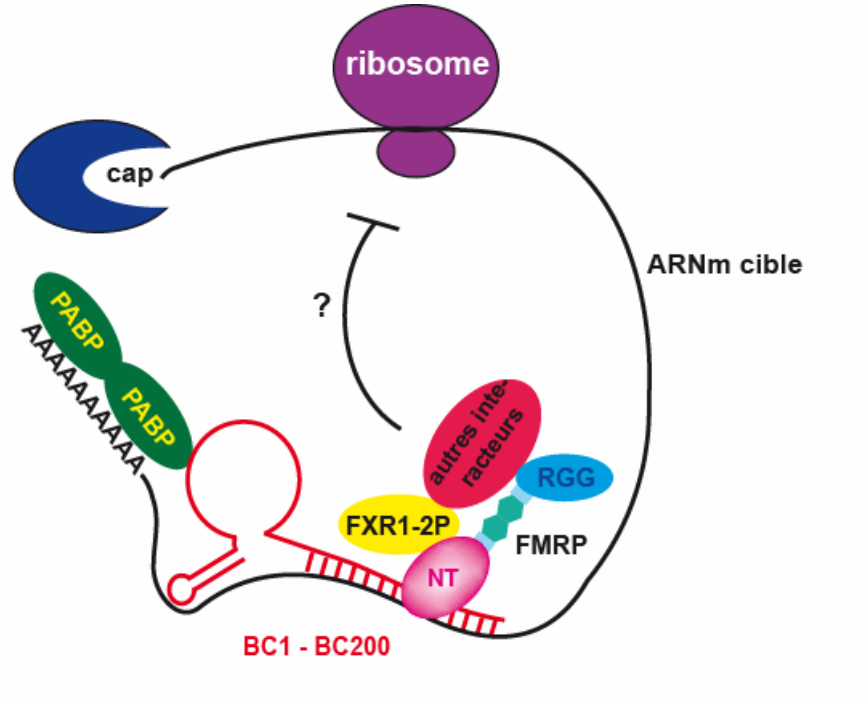


Figure 36 : Modèle proposé pour expliquer une répression traductionnelle des ARNm médiée par le complexe ARN BC1/BC200-FMRP

Dans le modèle proposé, l'extrémité N-terminale de la protéine FMRP pourrait interagir avec la partie 5' de la longue tige-boucle de l'ARN *BC1* ce qui stabiliserait et/ou faciliterait l'interaction de FMRP avec les ARNm cibles qui seraient alors traductionnellement réprimés. Les mRNP contenant la protéine FMRP et l'ARN *BC1* pourraient également contacter la protéine PABP (hypothèse basée sur l'interaction *in vitro* précédemment reportée entre *BC1*, PABP et eIF4A). Comme il a été suggéré pour d'autres complexes inhibiteurs, des facteurs supplémentaires pourraient également être impliqués dans cette répression. Finalement, l'interaction indirecte (à travers l'ARN *BC1*) avec l'extrémité N-terminale des ARNm servirait à laisser libre le domaine de fixation des ARN pour d'autres interactions ARN-protéines. Adapté de Zalfa et al, 2003 et Zalfa et al, 2005.

protéine MAP1B, pour l'ARNm *Arc* et α-CaMKII (Zalfa et al, 2003). Cependant, ce modèle est, aujourd'hui, réfuté par plusieurs équipes. En effet, l'interaction directe entre l'ARN BC1 et la protéine FMRP est controversée (Wang et al, 2005 ; Iacoangeli et al, 2008). En effet, plusieurs laboratoires indépendants n'ont pu montré, ni *in vitro* ni *in vivo*, l'existence d'une interaction spécifique entre l'ARN BC1 et la protéine FMRP (Wang et al, 2005 ; Iacoangeli et al, 2008). D'autre part, le recrutement des ARNm cibles de FMRP semble indépendant de l'ARN BC1 (Iacoangeli et al, 2008). L'ensemble de ces résultats contredit complètement le modèle proposé par l'équipe de C. Bagni. Il semble plutôt que l'ARN BC1 et la protéine FMRP réprimeraient la traduction indépendamment l'un de l'autre (Iacoangeli et al, 2008). Il reste, cependant, à vérifier si l'interaction observée entre l'ARN BC200 et la protéine FMRP est spécifique.

3/ Rôle possible de l'ARN BC1 dans la transmission du signal par les récepteurs D2 à la dopamine

Dans le cerveau, la transmission du signal par les récepteurs à la dopamine est essentiel pour le contrôle des activités motrices et cognitives (pour revues, Berke & Hyman, 2000 ; Obeso et al, 2000). Des altérations de ces récepteurs sont à l'origine de désordres neurologiques et psychiatriques. Les souris où le gène codant l'ARN BC1 a été délété montrent une augmentation de la transmission du signal par les récepteurs à la dopamine qui se traduit par une augmentation du taux de récepteurs présents (Centonze et al, 2007). Comme le taux d'ARNm codant pour ces récepteurs et le taux de traduction restent inchangés, l'augmentation du taux de récepteurs à la dopamine en absence de l'ARN BC1 n'est donc pas dûe à l'absence de régulation de la traduction. Par contre, il est possible que l'ARN BC1 contrôle indirectement l'activité des récepteurs à la dopamine en régulant, plutôt, la traduction des molécules impliquées dans le renouvellement et/ou la stabilité de ces récepteurs (Centonze et al, 2007).

Chapitre IV : La particule SRP

L'adressage des protéines vers leur compartiment d'activité se fait selon des processus très précis, qui diffèrent selon les compartiments cellulaires et la fonction de la protéine. Ce ciblage nécessite la présence dans les protéines d'une séquence signal spécifiant leur localisation cellulaire. Chez les eucaryotes, la particule de reconnaissance du signal (ou SRP) assure le transport des protéines membranaires ou de sécrétion vers le réticulum endoplasmique (pour revues, Lutcke, 1995 ; Keenan et al, 2001 ; Wild et al, 2002 ; Nagai et al, 2003 ; Egea et al, 2005 et Schwartz, 2007).

I/ Structure et composition de la particule SRP

1/ L'ARN 7S

L'ARN 7S, transcrit par l'ARN polymérase III, est le composant ARN de toutes les particules SRP excepté des particules chloroplastiques qui sont composées de seulement deux protéines (Keegstra & Cline, 1999). La taille de l'ARN 7S varie de 519 nucléotides chez *S. cerevisiae* (Hann & Walter, 1991) à 77 nucléotides chez *Mycoplasma mycoides* (Samuelsson & Guindy, 1990). Chez l'homme, l'ARN 7S compte 300 nucléotides. La structure secondaire de l'ARN 7S a été déterminée expérimentalement à l'aide de sondes enzymatiques et par radiocristallographie aux rayons X ***(Figure 37)*** (Gundelfinger et al, 1984 ; Zwieb, 1985 ; Larsen & Zwieb, 1991 ; Zwieb et al, 1996 ; Gorodkin et al, 2001 ; Weichenrieder et al, 2000 ; Wild et al, 2001 ; Hainzl et al, 2002 ; Hainzl et al, 2005 ; Oubridge et al, 2002 ; Kuglstatter et al, 2002 ; Yin et al, 2004 ; Huck et al, 2004 et pour revues, Wild et al, 2002 ; Nagai et al, 2003 ; Sauer-Eriksson & Hainzl, 2003 ; Doudna & Batey, 2004).

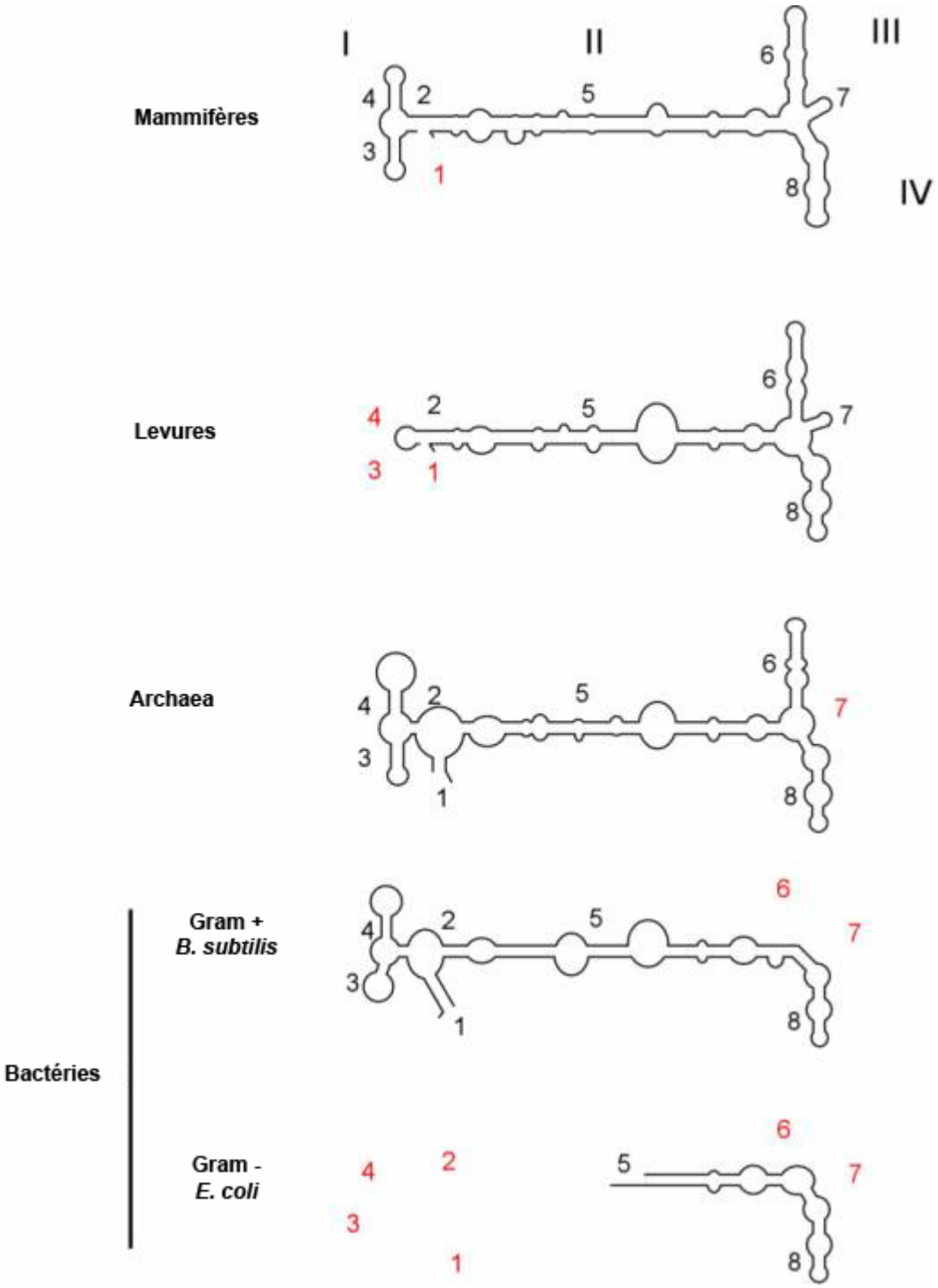


Figure 37 : Comparaison des structures secondaires des ARN 7S d'eucaryotes et leurs homologues d'archae et de bactéries

L'ARN 7S comporte quatre domaines structuraux indiqués en chiffres romains I à IV (Gundelfinger et al, 1984 ; Poritz et al, 1988). Sa structure secondaire compte huit hélices numérotées de 1 à 8 (Larsen & Zwieb, 1991). L'hélice 1 est uniquement présente chez les bactéries Gram +.

D'après les analyses phylogénétiques, quatre domaines structuraux différents (I-IV) ont été définis dans l'ARN 7S ***(Figure 37)*** (Gundelfinger et al, 1983 ; Poritz et al, 1988). L'ARN 7S comporte huit hélices numérotées de 1 à 8 (Larsen & Zwieb, 1991). L'hélice 1 est absente chez les eucaryotes et les bactéries Gram-. Le domaine I comprend deux courtes épingles et une tige courte formant une jonction et quatre hélices numérotées de 1 à 4. Le domaine II contient une longue hélice, l'hélice 5 qui lie les domaines III et IV. Le domaine III, comprenant l'hélice 6 et le domaine IV, comprenant l'hélice 8 peuvent se replier en épingle (Poritz et al, 1988). Le domaine IV est universellement conservé et contient la majorité des mutations délétères pour la fonction de l'ARN (Althoff et al, 1994). Chez *E. coli*, l'ARN 7S est nommé 4,5 S ; c'est un ARN de 114 nucléotides. Il se replie en une seule tige-boucle présentant des identités de séquence avec le domaine IV de l'ARN 7S humain ***(Figure 37)*** (Hsu et al, 1984 ; Poritz et al, 1988 ; Struck et al, 1988).

La particule SRP peut être subdivisée en deux domaines fonctionnels distincts : le domaine S et le domaine Alu ***(Figure 38)*** (Ullu et al, 1982b; Gundelfinger et al, 1983). Le domaine S comprend la partie centrale de l'ARN 7S (Siegel & Walter, 1988b) (hélices 6-8 et une partie de l'hélice 5), alors que le domaine Alu comprend les extrémités 5' et 3' de l'ARN 7S (hélices 2-4 et une partie de l'hélice 5) (Ullu et al, 1982b). Le domaine Alu de l'ARN 7S a servi d'élément précurseur dans la génération des éléments Alu : une famille de courtes séquences d'ADN répétitif, dispersées dans le génome des primates (Ullu et al, 1982a ; Ullu & Tschudi, 1984 ; Bovia & Strub, 1996). Des études de radiocristallographie ont montré que la région 5' du domaine Alu de l'ARN 7S (nt 1 à 46) adopte une structure en pseudo-nœud, dans laquelle les deux boucles sont appariées par appariement de type Watson-Crick ***(Figure 38 B/)*** (Weichenrieder et al, 2000). Le potentiel d'appariement des bases entre les deux boucles du domaine Alu de l'ARN est phylogénétiquement conservé, ce qui suggère un rôle fonctionnel de la structure en pseudo-nœud .

2/ Les protéines SRP (tableau VII)

La particule SRP est constituée de six protéines : SRP 9, SRP 14, SRP 19, SRP 54, SRP 68 et SRP 72, leur nom correspondant à leur poids moléculaire ***(Figure 38)***.

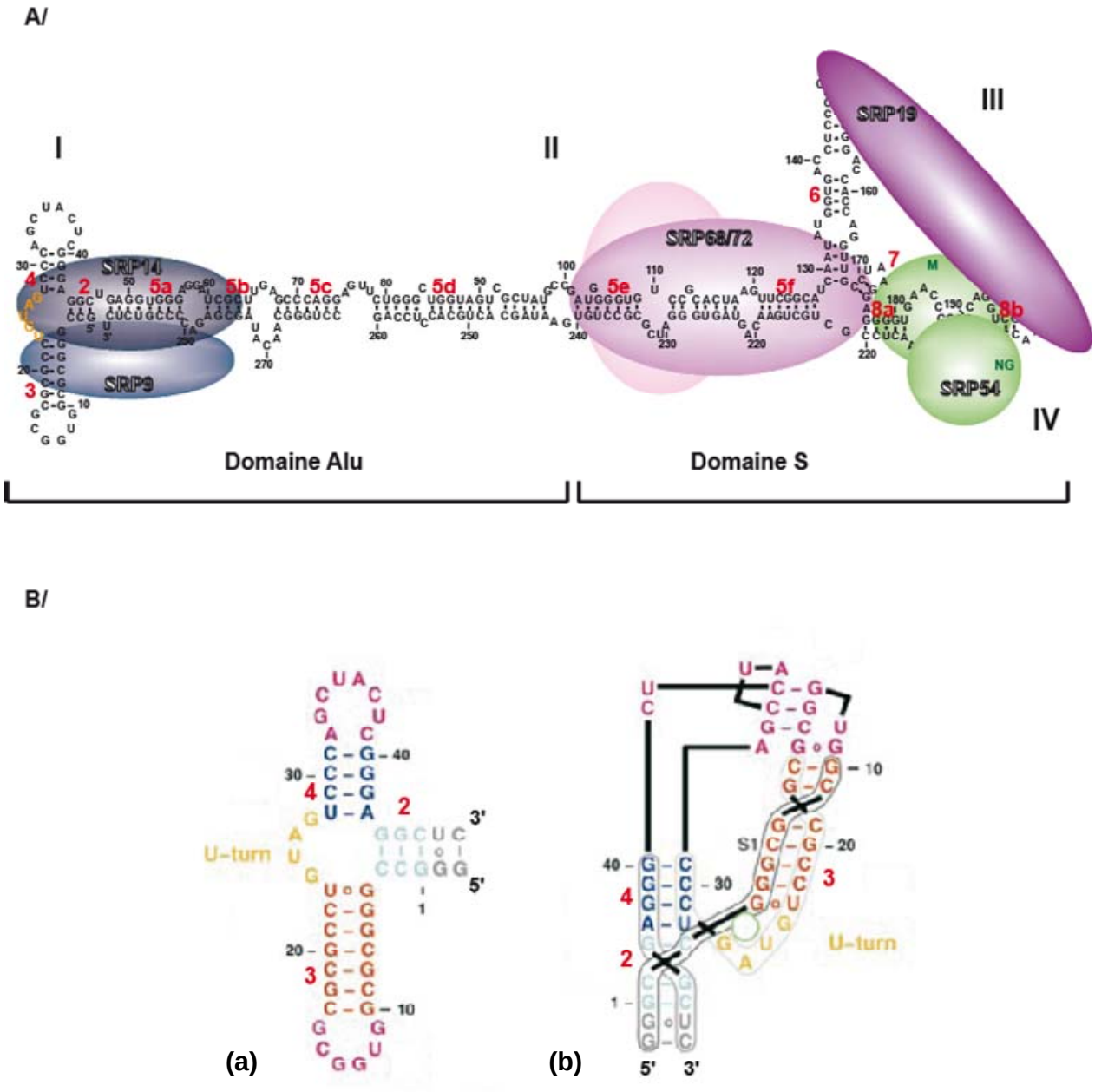


Figure 38 : Représentation schématique de l'organisation de la particule SRP des mammifères (A/) et de la structure secondaire du domaine Alu de l'ARN 7S (B/)

A/ La représentation schématique de l'organisation la particule SRP a été proposée par Wild et al, 2002. La localisation des protéines SRP sur l'ARN 7S est indiquée par des sphères de couleurs. Les protéines SRP 9/14 etSRP 68/72 forment des hétérodimères. M et NG indiquent les domaines M et NG de la protéine SRP 54, respectivement. Le domaine Alu et le domaine S sont également indiqués. Les quatre domaines structuraux de l'ARN 7S sont indiqués en chiffres romains. Les hélices sont numérotées en rouge (Larsen & Zwieb, 1991). En orange sont indiquées les bases essentielles à la fixation des protéines SRP 9 et 14. **B/** Structure secondaire du domaine Alu de l'ARN 7S avec deux paires de bases artificielles (gris) **(a)**. Topologie bidimentionnelle dérivée de la structure cristalline montrant l'architecture du pseudo-noeud formé par l'extrémité 5' du domaine Alu de l'ARN 7S **(b)**. D'après Weichenrieder et al, 2000.

Peu d'informations sont disponibles à ce jour sur les plus grandes sous-unités protéiques de la particule SRP : **SRP 68 et 72** (OMIM #604858 et OMIM #602122). Ce manque d'informations est probablement du à la difficulté de produire ces protéines recombinantes. Ce n'est que très récemment que la protéine SRP 68 (Yin et al, 2007) et l'hétérodimère 68/72 (Menichelli et al, 2007) ont pu être produits. Ces protéines sont uniquement présentes chez les eucaryotes, aucun homologue n'existe chez les archaea malgré la conservation de leur site de fixation sur l'ARN. Ces protéines présentent un caractère globalement basique (Lutcke et al, 1993 ; Lutcke, 1995).

La protéine **SRP 54** (OMIM #604857) est sans doute la plus importante de toutes les sous-unités de la SRP. Elle a été très conservée au cours de l'évolution (pour revues, Doudna & Batey, 2004 ; Luirink & Sinning, 2004) et elle est présente chez les eucaryotes, les archaea et les bactéries (Bhuiyan et al, 2000 ; Zwieb & Eichler, 2002). Chez *E. coli*, l'homologue de SRP 54 nommé p48 ou Ffh (*Fifty Four Homolog*) est l'unique protéine de la particule SRP (Poritz et al, 1990 ; Luirink et al, 1992 et pour revue, Keenan et al, 2001). Cette protéine comporte trois domaines : le domaine M carboxy-terminal, riche en méthionines, le domaine N amino-terminal suivi par le domaine G. Les domaines N et G sont reliés par un lien peptidique flexible (Keenan et al, 1998).

La protéine **SRP 19** (OMIM #182175) est présente chez tous les organismes qui possèdent l'hélice 6 de l'ARN 7S (Zwieb & Larsen, 1997). Aucun homologue n'a été trouvé dans les particules SRP bactériennes, mais il en existe un chez tous les archaea caractérisés et dont les génomes ont été séquencés à ce jour (Eichler & Moll, 2001). La structure 3D de la protéine SRP 19 a été établie chez l'homme (Wild et al, 2001 ; Kuglstatter et al, 2002) et chez deux espèces d'archaea (Pakhomova et al, 2002 ; Hainzl et al, 2002 ; Oubridge et al, 2002). Ces différentes structures révèlent que le coeur de la protéine est structuralement conservé et comprend trois brins β anti-parallèles flanqués de deux hélices α.

Les protéines **SRP 9 et 14** (OMIM #600707 et OMIM #600708) sont les seuls composants protéiques du domaine Alu de l'ARN 7S ***(Figure 38)***. Chez les mammifères, ces protéines existent sous la forme d'un hétérodimère qui se forme en absence de l'ARN 7S (Strub & Walter, 1990). La structure de l'hétérodimère consiste en un feuillet de 6 brins β anti-parallèles associés à 4 hélices α. L'hétérodimérisation de ces deux protéines est d'ailleurs nécessaire à la fixation à l'ARN 7S. Ces protéines se fixent dans une région comprenant

	PM (kDa)	Région d'interaction au sein de l'ARN 7S	Localisation	Conservation phylogénétique	Connaissances structurales	Réf.
SRP 9	9	domaine Alu, I, hélices 2-5	nucléole, cytoplasme	eucaryotes	hétérodimère avec SRP 14, structure cristalline résolue	(Strub et al, 1991 ; Bovia et al, 1995 ; Bovia et al, 1997 ; Birse et al, 1997; Weichenrieder et al, 1997 ; Weichenrieder et al, 2001; Weichenrieder et al, 2000)
SRP 14	14	domaine Alu, I, hélices 2-5	nucléole, cytoplasme	eucaryotes	hétérodimère avec SRP 9, structure cristalline résolue	(Strub et al, 1991; Bovia et al, 1995 Bovia et al, 1997 ; Birse et al, 1997; Weichenrieder et al, 1997; Weichenrieder et al, 2001; Weichenrieder et al, 2000)
SRP 19	19	domaine S, III, hélice 6	nucléole, cytoplasme	eucaryotes et archae	Structure cristalline résolue	(Wild et al, 2001; Kuglstatter et al, 2002 ; Pakhomova et al, 2002)
SRP 54	54	domaine S, IV, hélice 8	cytoplasme	eucaryotes, archae et bactéries	domaine M (riche en méthionines) cristallisé, domaine G (activité GTPase) et domaine N	(Poritz et al, 1990; Luirink et al, 1992; Bhuiyan et al, 2000 ; Keenan et al, 2001; Keenan et al, 1998; Clemons et al, 1999 ; Zwieb & Eichler, 2002)
SRP 68	68	domaine S, II, hélice 5	nucléole, cytoplasme	eucaryotes	hétérodimère avec SRP 72	(Lutcke et al, 1993; Iakhiaeva et al, 2005 ; Yin et al, 2007; Menichelli et al, 2007)
SRP 72	72	domaine S, II, hélice 5	nucléole, cytoplasme	eucaryotes	hétérodimère avec SRP 68	(Lutcke et al, 1993; Iakhiaeva et al, 2005 ; Yin et al, 2007; Menichelli et al, 2007)

Tableau VII : Caractéristiques des protéines SRP constituant la particule SRP

les extrémités 3' et 5' de l'ARN grâce à un site de fixation consistant en une région simple brin hautement conservée dont la séquence consensus est : UGUAA (UGUAG, chez l'homme) ***(en orange sur la Figure 38)*** (Strub et al, 1991).

II/ Assemblage de la particule SRP (figure 39)

Chez les eucaryotes, l'assemblage de la particule SRP se déroule dans deux compartiments cellulaires : le cytoplasme et le nucléole (Politz et al, 2000). L'ARN 7S ainsi que toutes les protéines SRP, à l'exception de la protéine SRP 54, ont été visualisés dans le nucléole (Jacobson & Pederson, 1998 ; Politz et al, 2000 ; Politz et al, 2002 ; Sommerville et al, 2005). Un modèle d'assemblage de la particule a été proposé chez les eucaryotes. Dans ce modèle, toutes les protéines SRP, à l'exception de la protéine SRP 54, sont transportées dans le nucléole où elles s'assemblent sur l'ARN 7S pour former la pré-particule SRP qui est ensuite exportée dans le cytoplasme. La fixation de la protéine SRP 54 complète finalement l'assemblage de la particule SRP ***(Figure 39)*** (Politz et al, 2000). Le système d'export nucléaire médié par le facteur CRM1 (Xpo1 chez la levure) serait nécessaire au transport de la pré-particule SRP dans le cytoplasme (Grosshans et al, 2001 ; Alavian et al, 2004 ; Sommerville et al, 2005). La localisation de l'ARN 7S dans le nucléole est strictement dépendante de son domaine Alu mais l'hélice 8 du domaine S semble également jouer un rôle (He et al, 1994 ; Jacobson & Pederson, 1998). Par contre, aucun facteur favorisant l'assemblage de la particule SRP, *in vivo*, n'est connu à ce jour. Une de nos hypothèses de travail est que le complexe SMN puisse jouer un rôle dans la biogenèse de cette particule.

De nombreuses études, réalisées *in vitro*, utilisant des protéines SRP recombinantes purifiées et l'ARN 7S produit par transcription *in vitro*, ont permis de décortiquer les modes d'interactions entre les différents constituants des particules SRP eucaryotes. Ainsi, la protéine SRP 19 et l'hétérodimère SRP 68/72 peuvent se fixer à l'ARN 7S individuellement, alors que l'association de la protéine SRP 19 à l'ARN 7S est indispensable à la fixation de la protéine SRP 54 (Walter & Blobel, 1983b). En effet, la

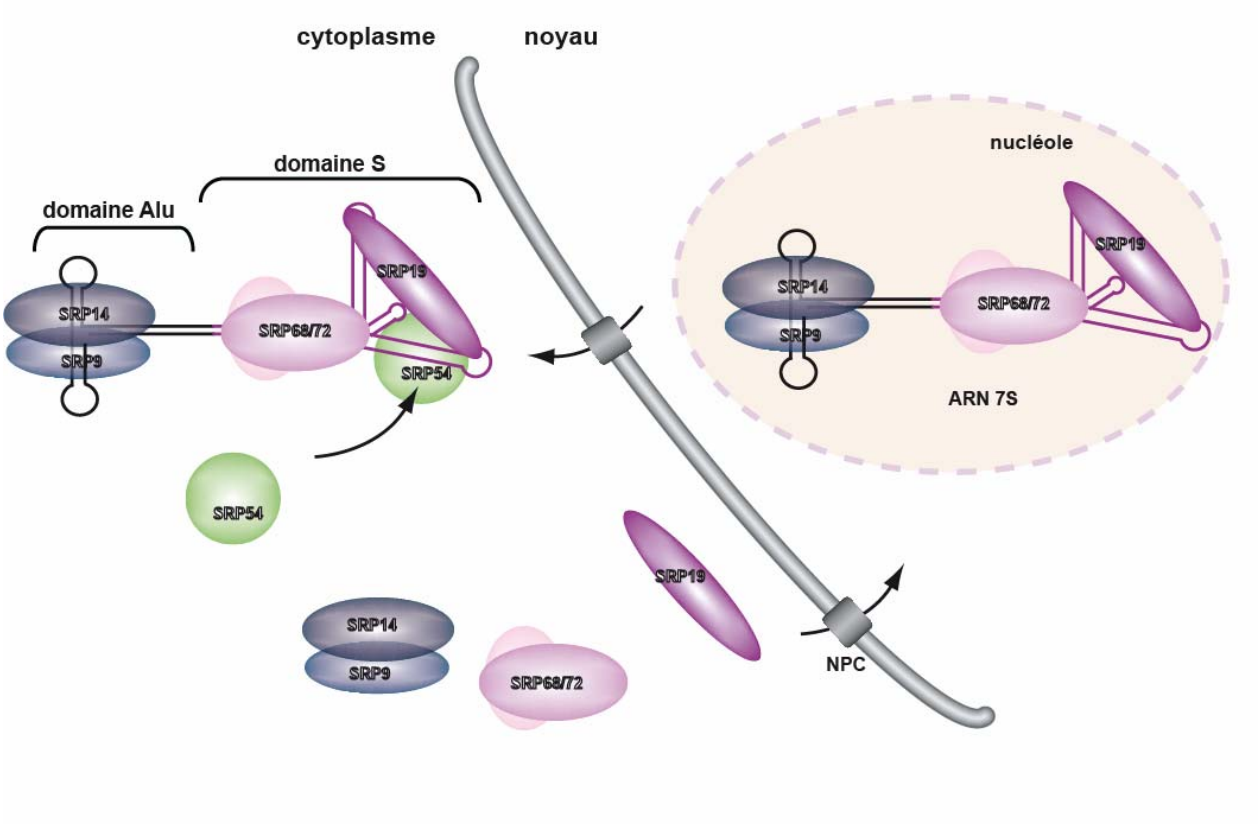


Figure 39 : Modèle proposé pour l'assemblage des protéines SRP avec l'ARN 7S

Chez les eucaryotes, l'assemblage de la particule SRP se déroule dans deux compartiments cellulaires : le cytoplasme et le nucléole. Selon ce modèle, toutes les protéines SRP, à l'exception de la protéine SRP 54, sont transportées dans le nucléole où elles s'assemblent à l'ARN 7S pour former la pré-particule SRP qui est ensuite exportée dans le cytoplasme. La fixation de la protéine SRP 54 complète finalement l'assemblage de la particule SRP (Politz et al, 2000).

fixation de la protéine SRP 19 conduit à un réarrangement conformationnel qui place les hélices 6 et 8 de l'ARN 7S de manière parallèle, ce qui est nécessaire à la fixation de la protéine SRP 54 (Wild et al, 2001 ; Hainzl et al, 2002 ; Kuglstatter et al, 2002 ; Oubridge et al, 2002 et pour revue, Nagai et al, 2003). *In vitro*, la présence de la protéine SRP 54 inhibe la fixation de la protéine SRP 19 à l'ARN 7S (Maity et al, 2006). Ce résultat implique que la protéine SRP 54 soit séquestrée, dans le cytoplasme, pour permettre le bon déroulement des premières étapes d'assemblage de la particule SRP et serait assemblée en dernier. La compartimentalisation spatiale fournirait, par conséquent, un niveau de régulation supplémentaire qui empêcherait toute compétition parmi les SRP (Maity et al, 2006). Les protéines SRP 68 et 72 se fixent au domaine S de l'ARN 7S indépendamment des protéines SRP 9 et SRP 14 (Siegel & Walter, 1988a). Bien que ces deux protéines puissent être dissociées de la particule SRP sous forme d'un hétérodimère (Walter & Blobel, 1983a), elles ne s'associent pas, entre elles, de manière efficace sans l'ARN 7S (Lutcke & Dobberstein, 1993). Un modèle d'assemblage a proposé que la protéine SRP 68 se fixerait en premier sur l'ARN, suivi d'un changement conformationnel permettant à la protéine SRP 72 de se fixer à la protéine SRP 68 (Lutcke & Dobberstein, 1993). Néanmoins, de récents résultats indiquent que la protéine SRP 72 aurait aussi la capacité de lier l'ARN 7S, en absence de SRP 68 (Iakhiaeva et al, 2005). Les protéines SRP 9 et 14 se fixent de manière coopérative au domaine Alu de l'ARN 7S. Il a été proposé que ces deux protéines formeraient, d'abord, un hétérodimère dans le cytoplasme, car seules aucune d'elles ne se fixe à l'ARN 7S (Strub & Walter, 1990). Puis, dans le nucléole, l'hétérodimère SRP 9/14 s'associerait au domaine Alu de l'ARN 7S (Weichenrieder et al, 2001).

III/ L'adressage des protéines par la particule SRP (Figure 40)

1/ La reconnaissance du peptide signal par la particule SRP

La synthèse des protéines destinées au réticulum endoplasmique est initiée dans le cytoplasme. Ces protéines contiennent une séquence signal ou peptide signal à leur

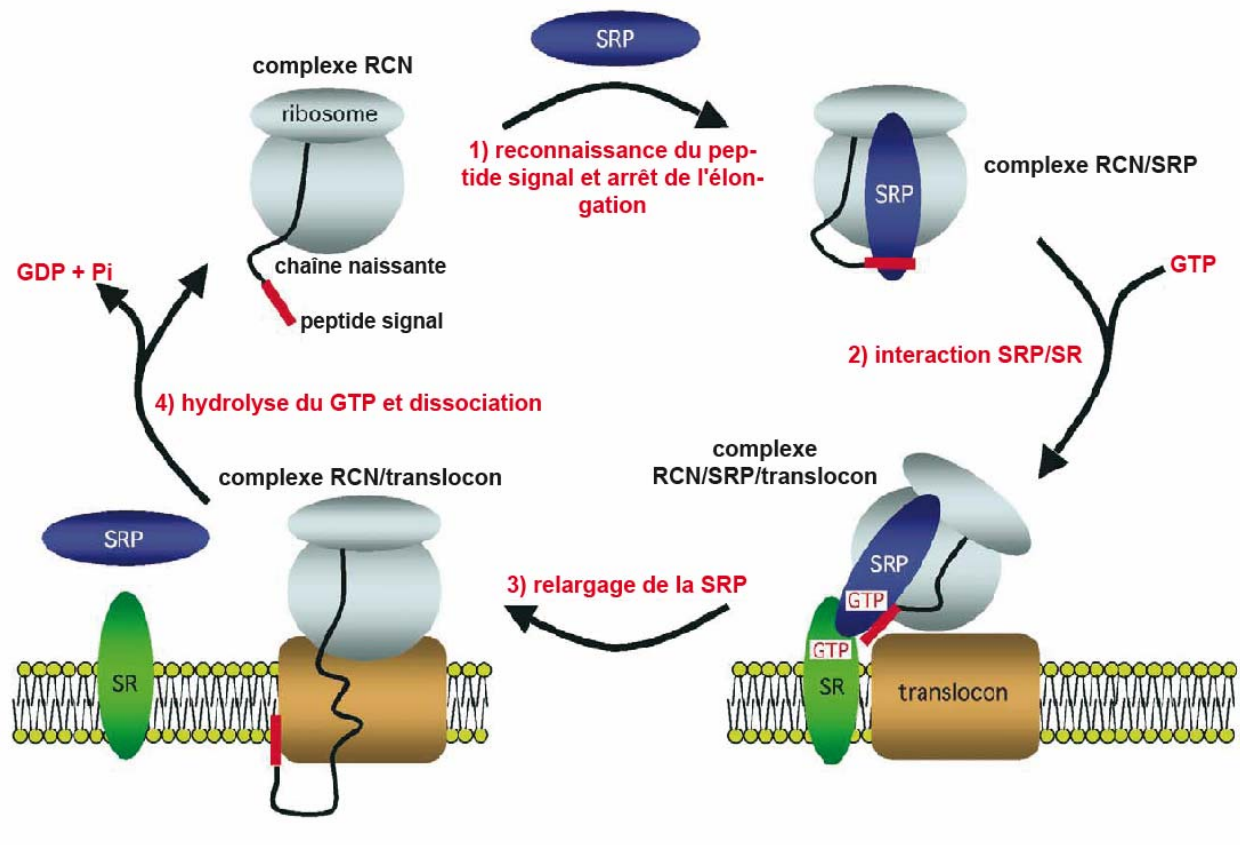


Figure 40 : L'adressage des protéines au réticulum endoplasmique par la particule SRP : un mécanisme d'insertion co-traductionnelle des protéines

Une chaîne polypeptidique naissante avec un peptide signal émergeant du ribosome est reconnue par la particule de reconnaissance du signal (SRP), causant alors l'arrêt de l'élongation de la traduction **(1)**. Le complexe formé du ribosome et de la chaîne protéique naissante est ensuite ciblé à la membrane du réticulum endoplasmique grâce à des interactions dépendant du GTP, qui sont mises en place entre la particule SRP et les récepteurs SR **(2)**. A la membrane, le peptide signal est reconnu par le translocon et la séquence signal est alors relarguée de la particule SRP **(3)**. Enfin, après l'hydrolyse du GTP, le complexe SRP-SR se dissocie **(4)**. Complexe RCN : complexe formé du ribosome et de la chaîne protéique naissante. D'après Egea et al, 2005.

extrémité N-terminale, qui émerge du ribosome et qui est reconnue par la particule SRP (pour revues, Keenan et al, 2001 ; Wild et al, 2004b ; Doudna & Batey, 2004). Cette séquence signal comporte de 20 à 30 résidus avec une région centrale riche en acides aminés hydrophobes (von Heijne, 1985). Le domaine C-terminal riche en méthionines (domaine M) de la protéine SRP 54 se lie à cette séquence (Romisch et al, 1990 ; Zopf et al, 1990 ; Keenan et al, 1998). Les deux autres domaines de cette protéine, les domaines N et G semblent également importants pour cette fixation, ainsi que l'ARN 7S (Kurzchalia et al, 1986 ; Krieg et al, 1986 ; Newitt & Bernstein, 1997 ; Cleverley & Gierasch, 2002). Des expériences ont montré l'existence d'interactions entre la protéine SRP 54 et les protéines ribosomiques et des interactions entre l'ARN 7S et les ARN ribosomiques (pour revue, Wild et al, 2004a). Le domaine Alu de l'ARN 7S semble responsable de l'arrêt de la synthèse protéique (Siegel & Walter, 1986 ; Poritz et al, 1988). En effet, après la fixation de la protéine SRP 54 au peptide signal, la particule SRP subit un changement conformationnel. Le domaine Alu se placerait alors au site d'entrée des facteurs d'élongation de la traduction sur le ribosome, bloquant ainsi la traduction (Terzi et al, 2004). Contrairement aux modèles proposés dans un premier temps, la structure de domaine Alu de l'ARN 7S ne ressemble pas à celle d'un ARNt. Ainsi, un mécanisme basé sur le mimétisme pour bloquer le site de fixation des ARNt par l'ARN 7S ne semble pas être impliqué dans l'arrêt de l'élongation de la traduction (Weichenrieder et al, 2001).

2/ Interaction avec le récepteur SR

L'ensemble du complexe est ensuite adressé à la membrane du réticulum endoplasmique grâce à l'interaction de la particule SRP avec un récepteur spécifique : le récepteur SR (pour revues, Doudna & Batey, 2004 ; Halic & Beckmann, 2005 ; Egea et al, 2005 ; Schwartz, 2007). Chez les eucaryotes, les récepteurs SR sont composés de deux sous-unités : SRα et SRβ (Gilmore et al, 1982 ; Meyer & Dobberstein, 1980 ; Tajima et al, 1986). SRα contient, comme le domaine G de la protéine SRP 54, un domaine à activité GTPase (Miller et al, 1995). L'association entre la particule SRP et le récepteur SR se fait grâce à l'interaction de ces deux domaines GTPases. La formation du complexe particule SRP-

récepteur SR est dépendante du GTP (Miller et al, 1993). Le peptide signal est reconnu par le translocon qui est un complexe de protéines formant un canal permettant l'intégration des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique (pour revues, Rapoport et al, 1996 ; Johnson & van Waes, 1999 ; Skach, 2007). Le transfert à travers la membrane du RE commence. Chaque GTPase joue le rôle d'activateur de l'autre. La particule SRP se dissocie du récepteur SR après hydrolyse du GTP en GDP et peut initier un nouveau cycle d'adressage (Connolly et al, 1991 ; Miller et al, 1993). Le ribosome est alors engagé au niveau du translocon, la traduction reprend.

Objectifs

L'ensemble des propriétés du complexe SMN décrites dans cette introduction illustre bien le très large panel de ses possibles fonctions. A cet égard, on comprend alors les difficultés rencontrées pour comprendre la physiopathologie de l'amyotrophie spinale. Depuis la découverte du gène *SMN* par l'équipe du Dr. J. Melki, la recherche a clairement démontré le rôle du complexe SMN dans l'assemblage et la régénération des complexes spliceosomaux impliqués dans l'épissage de l'ARN, une fonction essentielle dans tous les types cellulaires. Néanmoins le rôle de la protéine SMN en cause dans la maladie reste inconnu. Ce défaut spécifique des motoneurones, alors que la protéine SMN est exprimée de manière ubiquitaire**,** pose la question d'un rôle spécifique dans les neurones de la protéine SMN et/ou du complexe SMN. Comme nous l'avons décrit, différentes observations suggèrent un rôle possible de la protéine SMN et peut-être du complexe SMN, dans l'assemblage, le transport et la traduction des ARNm dans les neurones (pour revues, Monani, 2005 ; Briese et al, 2005 ; Pellizzoni, 2007). Lorsque j'ai débuté ce travail de thèse, la protéine SMN avait déjà été observée au sein de granules de transport des ARNm neuronaux mais peu d'information était disponible sur les protéines interagissant avec elle au sein de ces granules ou capables de faciliter son recrutement dans les granules. Il avait seulement été proposé que l'association de la protéine SMN avec la protéine hnRNP-Q/R intervienne dans le transport des ARNm de la β-actine le long des axones en croissance (Rossoll et al, 2003). Dans le but de mieux comprendre le rôle de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans les neurones, la recherche de partenaires potentiels de la protéine SMN au sein des granules à ARN était susceptible d'apporter des informations sur le rôle de cette protéine dans ces granules. Comme nous l'avons largement décrit, une autre protéine est aussi présente dans ces granules à ARN et joue un rôle dans la régulation de la traduction : la protéine FMRP (pour revue, Bardoni et al, 2006). Le fait que les deux protéines SMN et FMRP aient été observées chacune à la fois dans les granules à ARN et dans les cônes axonaux en croissance suggérait une interaction possible entre ces deux protéines. La possibilité d'une telle interaction était d'autant plus vraisemblable que la protéine FMRP contient des enchaînements riches en arginines et glycines (RG), éléments de séquence qui sont présent dans des protéines connues pour interagir avec la protéine SMN et qui sont importants pour la mise en place et la stabilité de l'interaction. La recherche d'une

telle interaction nous a donc amenés à développer des approches permettant de tester cette hypothèse à la fois *in vitro* et *in cellulo*, ce qui nous a permis d'obtenir des arguments convaincants de la possibilité d'une interaction entre ces deux protéines. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec F. Rage (IGMM, Montpellier, France) et H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France). Ils ont été publiés dans *J. Biol. Chem*. et sont décrits dans le premier chapitre de la partie « *Résultats-Perspectives* ».

La recherche d'ARN spécifiquement exprimés dans les cellules neuronales et l'étude de l'implication du complexe SMN dans leur biogenèse et leur fonction a constitué le second objectif de mon travail de thèse. Dans ce but, nous avons recherché des ARN déjà décrits dans la littérature, et spécifiquement exprimés dans les neurones. C'est le cas de deux petits ARN non codants, BC1 chez le rat et son homologue fonctionnel BC200 chez l'homme. Ces deux ARN sont uniquement exprimés dans les neurones et sont transportés spécifiquement dans les dendrites où ils contrôleraient l'initiation de la traduction de certains ARNm aux synapses (Wang et al, 2002 ; Zalfa et al, 2003 ; Wang et al, 2005 ; Kondrashov et al, 2005 ; Zalfa et al, 2005). Au cours de son stage post-doctoral dans l'équipe de G. Dreyfuss, S. Massenet avait déjà montré une interaction entre le complexe SMN purifié et l'ARN neuronal BC200 *in vitro*. J'ai ensuite confirmé ce résultat, au cours de mon D.E.A. L'interaction détectée, *in vitro*, suggère que le complexe SMN puisse jouer un rôle dans l'assemblage ou la fonction de la RNP BC200. Pour essayer de mieux comprendre la nature de cette interaction, j'ai débuté une analyse expérimentale de la structure secondaire de l'ARN BC200, ce qui n'avait jamais été fait jusque là. Cette étude m'a permis de définir le domaine de cet ARN requis pour l'interaction avec le complexe SMN. La description de ces travaux constitue le deuxième chapitre de la partie « *Résultats-Perspectives* ».

Au moment où je réalisai ces expériences, l'équipe de Tiedge identifiait une région de l'ARN BC1 nécessaire à son transport à longue distance dans les dendrites *(Muslimov et al, 2006)*. Cette région fixerait la protéine hnRNP-A2, qui jouerait un rôle dans son transport. Comme nous disposions de la protéine hnRNP-A2 au laboratoire, nous avons testé son interaction avec l'ARN BC200. L'expérience s'est révélée positive, nous avons donc débuté

l'étude de l'interaction de l'ARN BC200 avec la protéine hnRNP-A2. Cette étude était d'autant plus intéressante qu'aucune donnée n'est actuellement disponible quant au mode de transport de l'ARN BC200.

Enfin, l'ensemble des données décrites dans cette introduction suggère que le rôle ubiquitaire du complexe SMN ne se limite sans doute pas simplement à faciliter et contrôler l'assemblage des UsnRNP spliceosomales. Le fait qu'il interagisse avec des protéines qui sont des constituants de RNP ubiquitaires dans les cellules eucaryotes suggère qu'il pourrait avoir un rôle général dans l'assemblage de différentes RNP ubiquitaires dans les cellules eucaryotes, qui contiennent des ARN non codants. Néanmoins, les recherches dans ce domaine ont été très limitées jusque là. Comme nous l'avons vu, il existe une RNP qui est non seulement ubiquitaire chez les eucaryotes mais aussi chez les archaea et les bactéries, la particule SRP. La possibilité d'un rôle du complexe SMN était très intéressante à tester d'autant plus qu'aucun facteur impliqué dans son assemblage n'a été identifié à ce jour. A l'heure actuelle, la majorité des équipes travaillent sur le rôle du complexe SMN dans l'assemblage des UsnRNP spliceosomales. Il nous paraissait, donc, très important de préciser le rôle de ce complexe dans l'assemblage d'autres RNP ubiquitaires. Dans cette éventualité, cela permettrait de disposer d'un autre modèle que les UsnRNP et donc de mieux comprendre le mécanisme d'action du complexe SMN dans l'assemblage de RNP. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec A. Méreau (UMR 6061, Rennes, France) et seront présentés dans le troisième chapitre de la partie « *Résultats-Perspectives* ».

Mon travail de thèse porte donc à la fois sur la description des rôle spécifiques de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans les neurones et d'un rôle ubiquitaire supplémentaire du complexe SMN, chez les eucaryotes, ceci en vue d'apporter des informations utiles à la compréhension des bases moléculaires de l'amyotrophie spinale.

Matériels et Méthodes

I/ Matériels

1/ Souches et plasmides utilisés

1.1/ Les souches E. Coli

La souche DH5α d'*E. coli* (*sup*E44, Δ*lac*U169 (Φ80 *lac*ZΔM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1) (Hanahan, 1983) a été utilisée pour la production et la purification de plasmides.

La souche BL21 (DE3) d'*E. coli* (F–, *omp*T, *hsd*S_B (r_B–, m_B–), *dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS, Cm^r) (Studier & Moffatt, 1986) a été utilisée pour la production de protéines recombinantes.

1.2/ Les cellules d'organismes eucaryotes

Cellules HeLa : N°ATCC® : CCL-2™ (Scherer et al, 1953) ; lignée cellulaire cancéreuse provenant d'un prélèvement effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, et décédée en 1951, **He**nrietta **La**cks.

Cellules HeLa Tet-Off® (Clontech) : (Gossen & Bujard, 1992) ; cette lignée de cellules HeLa exprime de manière stable la protéine tTA, un activateur de transcription dont l'activité dépend de la tétracycline. L'expression d'une protéine d'intérêt peut donc être régulée, au sein de cette lignée cellulaire en fonction de la concentration en tétracycline dans le milieu. Ces cellules ont été utilisées pour l'établissement d'une lignée cellulaire exprimant de manière stable la protéine Gemin 2 contenant une étiquette Flag à son extrémité N-terminale (Flag-Gemin2).

Cellules 293 [HEK-293] : N°ATCC® : CRL-1573™ (Graham et al, 1977) ; lignée de cellules embryonnaires humaines de reins.

Cellules SH-SY5Y : N° ATCC® : CRL-2266 (Biedler et al, 1978) ; lignée de cellules de neuroblastomes humains établie à partir de tumeurs métastasiques.

Cellules MN1 : lignée cellulaire dérivant de motoneurones embryonnaires de la moelle épiniaire de souris (Salazar-Grueso et al, 1991).

1.3/ Les plasmides utilisés

1.3.1/ Plasmides recombinant utilisés pour la production d'ARN in vitro

Les plasmides dans lesquels sont insérés les séquences codant les snRNA U1 (pU1X) (Hamm et al, 1988) et U6 (pHU6-1) (non publié) de vertébrés nous ont été fournis, respectivement, par les équipes de T. Pederson (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) et G. Dreyfuss (Howard Hughes Medical Institute, Philadelphie, USA). Les constructions plasmidiques pUC18-BC200, pUC18-BC1 et pUC18-7S ont été réalisées au laboratoire par S. Massenet et F. Schlotter. Elles dérivent du plasmide pUC18 (Yanisch-Perron et al, 1985). La séquence codant l'ARN BC200, l'ARN BC1 ou l'ARN 7S a été placée sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. Les contructions permettant l'expression de mutant de l'ARN BC200 ou de l'ARN 7S dérivent, respectivement, du plasmide pUC18-BC200 et pUC18-7S et contiennent des ADNc codant des ARN BC200 ou 7S tronqués.

1.3.2/ Plasmides utilisés pour la production d'une lignée de cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2

• Plasmides recombinant : le plasmide pcDNA3-FlagGemin2 nous a été fourni par l'équipe de G. Dreyfuss (Liu et al, 1997). Il dérive du plasmide pcDNA3 (Invitrogen)°et contient la séquence codant la protéine Gemin 2 fusionnée à une étiquette Flag clonées entre les sites H*ind*III-X*ba*I de la cassette de clonage. Il a servi de plasmide de départ pour le sous-clonage de la séquence codant la protéine Flag-Gemin2 dans le plasmide pTRE2 (Clontech), sous le contrôle du promoteur P_hCMV régulé par la tétracycline.

• Plasmide pTK-Hyg (Clontech, n° d'accession : U40398) : vecteur de sélection à l'hygromycine.

1.3.3/ Plasmides recombinant utilisés pour la production de protéines in vitro et in cellulo

Les plasmides permettant l'expression des protéines Flag-FMRP (pTL1 iso7 Flag-FMRP) (Devys et al, 1993), FXR1P et FXR2P (pSG5 FXR1P et pSG5 FXR2P) nous ont été fournis par H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France). Des délétions à l'intérieur du

plasmide pTL1 iso7 Flag-FMRP, réalisées par PCR à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ont permis de produire les plasmides pTL1 iso7 Flag-FMRPΔ470-485, exprimant la protéine Flag-FMRPΔ470-485 (délétion des aa 470 à 485), et iso7 Flag-FMRPΔ1-134, exprimant la protéine Flag-FMRPΔ1-134 (FMRPΔNDF) (délétion des 134 aa N-terminaux). Les fragment d'ADN codant pour la protéine FMRPΔ527-632 (FMRPΔRGG) (délétion des 106 aa C-terminaux) et FMRPΔ470-632 (délétion des 162 aa C-terminaux) ont été sous-clonés sous le contrôle du promoteur CMV dans le plasmide Flag-pcDNA3 (Friesen et al, 2001b).

Les plasmides permettant l'expression des protéines Flag-SMN WT (pcDNA3-Flag-SMN), GST-SMN WT, SMNΔYG (délétion des 26 aa C-terminaux), SMNΔEx7 (délétion des aa codant l'exon 7), SMNΔTudor (délétion des aa correspondant à l'exon 3) et SMNΔEx2B (délétion des aa correspondant à l'exon 2B) nous ont été fournis par l'équipe de G. Dreyfuss (Liu & Dreyfuss, 1996 ; Liu et al, 1997 ; Pellizzoni et al, 1998 ; Paushkin et al, 2000).

Les fragment d'ADN codant la protéine SMNΔN27 (délétion des 27 aa en N-terminal) ont été générés par PCR à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques et du plasmide pcDNA3-Flag-SMN. L'insert a été sous-cloné sous contrôle du promoteur CMV dans le plasmide Flag-pcDNA3 (Friesen et al, 2001b).

Les constructions plasmidiques permettant la production des proteines Flag-Gemin 2, myc-Gemin 3, myc-Gemin 4, Flag-Gemin 5, Gemin 8, His-Unrip, Flag- Snurportin1 et Flag-Sm B ont été précédemment décrits et nous ont été fournis par les équipes de G. Dreyfuss et L. Pellizzoni (Charroux et al, 1999 ; Pellizzoni et al, 1999 ; Charroux et al, 2000 ; Friesen & Dreyfuss, 2000 ; Gubitz et al, 2002 ; Massenet et al, 2002 ; Carissimi et al, 2005 ; Carissimi et al, 2006a). Pour la production de la protéine GST-Snurportin1 chez *E. coli*, les fragment d'ADN correspondant à la phase ouverte de lecture ont été obtenus par amplification par PCR à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques. Ils ont été clonés dans le plasmide pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences). Les fragment d'ADN correspondant à la phase ouverte de lecture des protéines Gemin 6 and Gemin 7 ont été obtenus par amplification PCR à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques et ont été clonés sous le contrôle du promoteur CMV dans le plasmide Flag-pcDNA3 (Friesen et al, 2001b).

2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant

Milieu LB (Luria Bertani) : peptone pancréatique animale 5 g/l ; peptone trypsique de caséine 5 g/l ; extrait de levure 5 g/l ; NaCl 10 g/l.

Le pH est ajusté à 7,5 avec NaOH 10 N. Le milieu de culture est ensuite autoclavé 20 min. à 121°C sous une pression de 1 bar.

Milieu solide LB : l'agar est ajouté à raison de 17 g par litre de milieu de culture LB avant stérilisation à l'autoclave.

Milieu LBA : l'ampicilline (100 mg/ml) est ajouté après autoclave dans le milieu de culture LB à une concentration finale de 100 µg/ml.

TE : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 ; EDTA 1 mM.

TBE : Tris borate 89 mM, pH 8,3 ; EDTA 2 mM.

PBS 10X : NaCl 1,37 M ; KCl 27 mM; KH_2PO_4 11,5 mM; Na_2HPO_4 64 mM.

RSB 100 : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. $MgCl_2$ 2,5 mM ; NaCl 100 mM.

RSB 150 : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. $MgCl_2$ 2,5 mM ; NaCl 150 mM.

RSB 200 : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. $MgCl_2$ 2,5 mM ; NaCl 200 mM.

RSB 500 : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. $MgCl_2$ 2,5 mM ; NaCl 500 mM.

Blotting buffer 10X : Tris 500 mM ; glycine 145 mM.

Solution de rouge Ponceau : Acide acétique 5% (v/v) et Ponceau S 0,1% (p/v).

Solution de transfert : Blotting buffer 1X ; ethanol 20% (v/v).

Solution de polyacrylamide dénaturante : Acrylamide/Bisacrylamide (23,75/1,25) 25 % (p/v) ; TBE 1X ; urée 8 M.

Solution de polyacrylamide native : Acrylamide/Bisacrylamide (38/2) 40 % (p/v) ; TBE 1X.

Solution de bleu de dépôt agarose (6X) : EDTA 125 mM ; SDS 2 % (v/v) ; glycérol 25 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,12 % (p/v).

Solution de bleu de formamide : EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,05 % (p/v) ; bleu de xylène cyanol 0,05 % (p/v) dans de la formamide désionisée.

Solution de bleu de dépôt (non dénaturant) pour les expériences de retard sur gel (bleu CSB) : HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; glycérol 40 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,05 % (p/v) ; bleu de xylène cyanol 0,03 % (p/v).

Tampon d'élution : Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; EDTA 1 mM ; SDS 1% .

3/ Anticorps

Tous les anticorps utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans le ***Tableau VIII***.

II/ Méthodes

1/ Culture cellulaire et technique de transfection

1.1/ Le milieu de culture

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (FBS), 10 U/ml de penicilline/streptomycine et 2,9 mg/ml de glutamine (Gibco). Les cellules sont cultivées sur des boîtes de 100 mm à 37°C, sous une atmosphère humide et à 5% de CO_2.

1.2/ La technique de transfection

Les cellules, à environ 60% de confluence, sont transfectées avec 10 µg d'ADN, à l'aide du kit de transfection JetPEI (PolyPlus Transfection), selon les recommandations du fabricant. Après une nuit d'incubation avec l'ADN, les cellules sont lavées et remises en culture. 48 h. après la transfection, les cellules sont utilisées pour des expériences d'immunosélection.

2/ Génération d'une lignée de cellules HeLa Tet-Off exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2

La génération d'une lignée exprimant de manière stable la protéine Gemin 2 portant une étiquette Flag a été obtenue en suivant les recommandations du fabricant (BD Biosciences) et en accord avec les conditions précédemment établies par Pellizzoni et al. (Pellizzoni et al, 2002a), excepté que le système Tet-Off a été utilisé à la place du système Tet-On. Les cellules HeLa Tet-Off expriment de manière stable la protéine tTA, un activateur

A/

Dénomination de l'anticorps	Utilisation	Origine
Anti-**SMN** (2B1) anticorps monoclonal de souris (Liu & Dreyfuss, 1996)	Immunoprécipitation	G. Dreyfuss (Howard Hughes Medical Institute, Philadelphie, USA)
Anti-**SMN** (62E7) anticorps monoclonal de souris Non publié	Western-Blot Dilution utilisée : 1/600ème	
Anti-**Gemin2** (2E17) anticorps monoclonal de souris (Liu et al, 1997)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/300ème	
Anti-**Gemin3** (12H12) anticorps monoclonal de souris (Charroux et al, 1999)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/1000ème	
Anti-**Gemin4** (17D10) anticorps monoclonal de souris (Charroux et al, 2000)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/400ème	
Anti-**Gemin5** (10G11) anticorps monoclonal de souris (Gubitz et al, 2002)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/500ème	
Anti-**Gemin6** (20H8) anticorps monoclonal de souris Non publié	Western-Blot Dilution utilisée : 1/20ème	L. Pellizzoni (Dubelcco Telethon Institute at the Institute of Cell Biology (CNR), Rome, Italie)
Anti-**Gemin8** (1F8) anticorps monoclonal de souris (Carissimi et al, 2006a)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/50ème	
Anti-**Unrip** (3G6) anticorps monoclonal de souris (Carissimi et al, 2005)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/50ème	
Anti-**Sm** (Y12) anticorps monoclonal de souris (Lerner et al, 1981)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/500ème	G. Dreyfuss (Howard Hughes Medical Institute, Philadelphie, USA)
Anti-**hnRNPA1** (4B10) anticorps monoclonal de souris (Pinol-Roma et al, 1988)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/1000ème	
Anti-**hnRNPC1/C2** (4F4) anticorps monoclonal de souris (Choi & Dreyfuss, 1984a ; Choi & Dreyfuss, 1984b)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/1000ème	
Anticorps non immunogène **SP2/O**	Immunoprécipitation	
Anti-**SRP54** anticorps monoclonal de souris	Western-Blot Dilution utilisée : 1/200ème	BD Biosciences
Anti-**FMRP** (1C3) anticorps monoclonal de souris (Devys et al, 1993)	Western-Blot Dilution utilisée : 1/100ème	H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France)
Anti-**FMRP** (7G1) anticorps monoclonal de souris (Brown et al, 2001)	Immunoprécipitation	
Anti-**β-tubuline I** anticorps monoclonal de souris	Immunoprécipitation	SIGMA

B/

Dénomination de l'anticorps	Utilisation	Origine
Anticorps secondaires de souris (IgG), couplés à la péroxydase	Western-Blot Dilution utilisée : 1/10000ème	Amersham

Tableau VIII : anticorps primaires (A/) et secondaires (B/) utilisés au cours de ce travail

de transcription, dont l'activité dépend de la présence de tétracycline dans le milieu de culture. Dans ces cellules, il est donc possible de réguler l'expression d'un gène d'intérêt si celui-ci est sous le contrôle d'un promoteur portant l'élément TRE (*Tetracycline Response Element*) reconnu par le facteur tTA. Ces cellules (avec un taux de confluence d'environ 80%) ont été co-transfectées, par les plasmides pTRE2-FlagGemin2 et pTK-hyg dans des rapports variant de 5 à 20, à l'aide du kit CalPhos^{TM} Mammalian Transfection (Clontech) selon les recommandations du fabricant. Environ 48 h. après la co-transfection, l'hygromycine a été ajoutée au milieu de culture à des concentrations variant de 100 à 400 µg/ml (milieu de sélection). La majorité des cellules ont commencé à mourir au bout de 4 à 5 jours, excepté celles ayant intégrées le gène de résistance à l'hygromycine. Après 2 à 4 semaines, des clones résistant à l'hygromycine sont apparus sur les boîtes. Tous les clones ont été isolés et repiqués et l'expression de la protéine Flag-Gemin2 a été vérifiée par la technique de Western-Blot.

3/ Purification des complexes SMN

3.1/ Principe

Les complexes SMN sont purifiés comme, précédemment, décrit par Pellizzoni et al. (Pellizzoni et al, 2002a). Des extraits cellulaires totaux, préparés à partir des lignées HeLa Tet-Off exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin 2 et parentale, sont repris dans le tampon RSB 100 contenant 0,1% d'Igepal et des inhibiteurs de protéases (Roche). Les extraits sont brièvement soniqués et centrifugés à 10.000 rpm pendant 15 min. Les surnageant sont ensuite filtrés (0,22 µm) et ajoutés aux anticorps anti-Flag immobilisés sur billes d'agarose (Sigma) pendant 2 h. à 4°C. Les billes sont ensuite lavées dans le tampon RSB 100 contenant 0,02% d'Igepal. Les billes sont encore lavées à 3 reprises avec le tampon RSB 500 contenant 0,02% d'Igepal pendant 15 min à 4°C. Après 3 derniers lavages dans le tampon RSB 100 contenant 0,02% d'Igepal, les complexes SMN sont élués par déplacement compétitif des protéines Flag-Gemin2 des billes avec 0,5 mg/ml de peptides Flag (Sigma) dans le tampon RSB 100 contenant 0,02% d'Igepal pendant 1 h. à 4°C. La composition des

complexes SMN est ensuite analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et révélée par coloration à l'argent et par Western-blot.

3.2/ Analyse par coloration à l'argent

La coloration à l'argent du gel est réalisée automatiquement (Hoefer Processor Plus, Amersham) et consiste à faire passer successivement 4 solutions différentes entrecoupées de lavages. La première étape consiste à fixer le gel pendant 20 min. dans la solution 1 (acide acétique 10% ; éthanol 20% (v/v)). Après 4 lavages successifs de 15 min., le gel est incubé pendant 1 min. dans la solution 2 ($Na_2S_2O_3$ 0,02% (p/v)). Après 2 lavages rapides, le gel est incubé pendant 30 min. dans la solution 3 ($AgNO_3$ 0,01% (p/v)). Le gel est ensuite rincé à l'eau et incubé avec la solution 4 (Na_2CO_3 2,5% (p/v) ; formaldéhyde 0,01% (v/v)). Cette dernière solution est appelée solution de développement, elle permet de révéler la présence des protéines séparées par électrophorèse. Le développement est, finalement, stoppé par l'ajout de la solution 1.

4/ Techniques d'analyse par empreintes enzymatiques et chimiques

4.1/ Préparation des ARN

- **Production de transcrits non-radioactifs**

ADN matrice linéarisée	2 µg
Tampon de transcription 5X (HEPES-KOH 400 mM, pH7,5 ; $MgCl_2$ 120 mM ;spermidine 10 mM ; DTT 200 mM)	
rNTP	25 mM de chaque
T7 RNA polymérase purifiée d'*E. coli* (61 U/µl)	61 U
H_2O	qsp 30 µl

Le mélange est incubé 3 h. à 37°C, puis la DNase I (Amersham Pharmacia, 7,5 U) est ajoutée, et le mélange est, à nouveau, incubé 30 min. à 37°C. Les transcrits sont purifiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 8%, puis élués une nuit à 4°C dans du tampon d'élution à forte concentration saline (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et*

solutions d'usage courant), avant d'être précipités avec de l'ethanol 96% en présence d'acétate de sodium 0,3 M et 1 µg de glycogène. Les ARN sont ensuite repris dans de l'eau stérile.

• Marquage des ARN à leur extrémité 5'

Déphosphorylation de l'extrémité 5' des ARN

ARN à déphosphoryler repris dans de l'eau stérile	8 µl
Tampon CIP 10X (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 ; $MgCl_2$ 0,1 M)	
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas)	1U

Les ARN sont incubés 1 h. à 37°C, extraits au phénol/chloroforme, puis précipités comme précédemment et repris dans de l'eau stérile.

Marquage en 5' des ARN

ARN déphosphorylés repris dans de l'eau stérile	7 µl
ATP [γ^{32}P] (GE Healthcare, 3000 Ci/mmol)	10 µCi
Tampon PNK (Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6 ; $MgCl_2$ 100 mM ; DTT 50 mM ; Spermidine 1 mM ; EDTA 1 mM)	
T4 polynucléotide kinase (MBI Fermentas, 10 U/µl)	10 U

Le mélange est incubé 45 min. à 37°C, puis les transcrits sont purifiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 8%, élués une nuit à 4°C dans un tampon d'élution (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*), et précipités comme décrit précédemment.

• Marquage des ARN à leur extrémité 3'

ARN purifié	500 ng
Tampon 10X (Hepes-KOH 250 mM, pH 7,9; $MgCl_2$ 90 mM ; DTT 15 mM ;BSA 50 µg/ml)	
ATP	100 mM
[5'-^{32}P] pCp (GE Healthcare, 3000 Ci/mmol)	10 µCi
T4 ARN ligase (MBI Fermentas)	20 U

Le mélange est incubé une nuit à 4°C à l'abri de la lumière puis les transcrits sont purifiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 8%, élués une nuit à 4 °C dans un tampon

d'élution (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*) et précipités comme décrit précédemment.

• Production de transcrits radioactifs *in vitro*

ADN à transcrire (plasmide linéarisé)	1 µg
Tampon de transcription 5X (HEPES-KOH 400 mM, pH7,5 ; $MgCl_2$ 120 mM ; spermidine 10 mM ; DTT 200 mM)	
rNTP (rATP, rCTP, rGTP)	10 mM de chaque
UTP (0,5 mM)	0,5 mM
αUTP [^{32}αP] (GE Healthcare, 800 Ci/mmol)	10 µCi
RNasin (RNA guard Pharmacia Biotech)	35,7 U
T7 RNA polymérase purifiée d'*E. coli*	61 U
H_2O	qsp 15 µl

Le mélange est incubé 3 h. à 37°C, puis la DNase I (Amersham Pharmacia, 7,5 U) est ajoutée, et le mélange est, à nouveau, incubé 30 min à 37°C. Les transcrits sont purifiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 8%, élués une nuit à 4°C dans un tampon d'élution (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*), extraits au phénol/chloroforme, puis précipités comme précédemment. Les ARN sont ensuite repris dans de l'eau stérile.

4.2/ Analyse de la structure secondaire d'un ARN en solution par utilisation de sondes enzymatiques (Figure 41)

La RNase T1 hydrolyse spécifiquement les ARN en 3' des résidus guanines, préférentiellement dans les segment non appariés, lorsqu'elle est utilisée en conditions limitantes. La RNase T2 hydrolyse préférentiellement les régions en simple-brin, lorsqu'elle est utilisée en conditions limitantes. Cette enzyme agit sans spécificité vis-à-vis des

A/

Sondes	PM (kDa)	Cibles	Produit généré	Informations complémentaires
ENZYMATIQUES				
RNAse T1	11000	G non apparié	...Gp (3'p)	tampon tris 1x
RNAse T2	36000	N non apparié	...Np (3'p)	
RNAse V1	15900	N apparié	pN... (5'p)	tampon tris 1x nécessité la présence d'ions divalents
CHIMIQUES				
DMS	126	N1A, N3C, N7G	**N1**-CH_3 **N3**-CH_3 **N7**-CH_3	tampon cacodylate
CMCT	424	N3U>N1G	**N3**-C=N-R NH-R'	tampon borate exclusivement
Kéthoxal	148	N1G, N2G	**N1**-CHOH **N2**-CROH	tampon cacodylate

B/

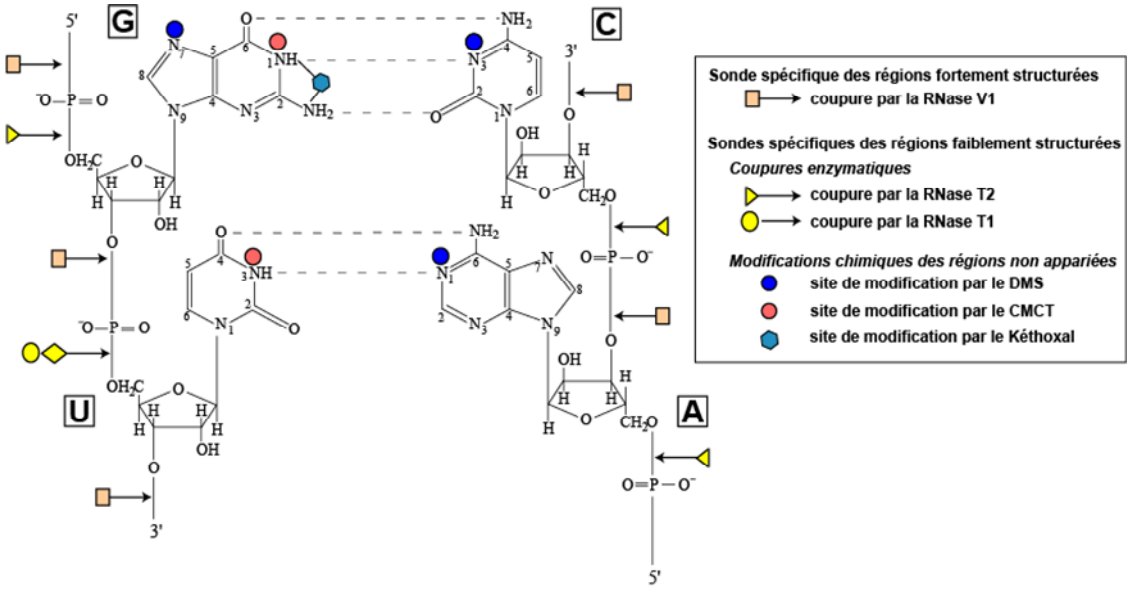


Figure 41 : La cartographie des ARN en solution

A/ Caractéristiques et spécificité d'action des sondes chimiques et enzymatiques utilisées pour la cartographie des ARN en solution. Les sondes chimiques ou enzymatiques utilisées au laboratoire, leurs poids moléculaires (PM), leurs cibles, les produits générés et des informations complémentaires sont indiqués dans ce tableau. **B/** Représentation schématique des positions modifiées au sein des ARN par l'action des sondes chimiques et des liaisons phosphodiesters coupées par l'action des sondes enzymatiques.

nucléotides et, comme la RNase T1, libère des fragment avec des extrémités 3'-phosphate (3'-P) et 5'-hydroxyle (5'-OH). La RNase V1 hydrolyse préférentiellement les régions en double-brin et les régions structurées par empilement de bases, ceci avec peu de spécificité vis-à-vis de l'identité des résidus. Elle libère des fragment avec des extrémités 3'-OH et 5'-P.

Pour l'étude de la structure d'ARN transcrits in vitro et marqués radioactivement à leur extrémité 3', *et pour la mise en évidence des nucléotides protégés contre l'action des RNAses par le complexe SMN,* les mélanges réactionnels suivant sont réalisés :

Cas n°1 : étude de la structure d'ARN transcrits in vitro et marqués radioactivement à leur extrémité 3' :

ARN marqué en 3' (25 fmol)	25.000 cpm
ARNt de levure	2 µg
Tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; $MgCl_2$ 2,5 mM ; KCl 100 mM)	qsp 40 µl

Cas n°2 : mise en évidence des nucléotides protégés contre l'action des RNAses par le complexe SMN :

ARN marqué en 3' (25 fmol) ou ARN marqué en 3' et fixé au complexe SMN (comme décrit *3.2/ Analyses des interactions ARN/complexe SMN)*	10.000 cpm
ARNt de levure	5 µg
Tampon RSB 100	qsp 50 µl

Les ARN sont renaturés 5 min. à 65°C, puis 10 min. à température ambiante. Les enzymes T1, T2 ou V1 (cas n°1) ou T1, A et V1 (cas n°2) sont ensuite ajoutées et leur action est arrêtée après 10 min. d'incubation à 30°C, en placant le mélange réactionnel à 4°C et en ajoutant une solution d'arrêt (EDTA 4,8 mM ; ARNt 20 µg). Un témoin sans enzyme est également réalisé afin de distinguer les coupures naturelles de l'ARN de celles générées par les enzymes et un témoin sans complexe SMN est également réalisé dans le cas n°2. L'arrêt des réactions est suivi d'une extraction au phénol/chloroforme puis d'une précipitation à l'ethanol à 96% en présence d'acétate de sodium 0,3 M final. Le culot d'ARN est lavé avec de l'ethanol à 70%,

séché, puis repris dans du bleu de formamide. Une hydrolyse statistique de l'ARN est réalisée en incubant 25.000 cpm d'ARN marqué en 5' avec du bicarbonate de sodium 10 mM (pH 9,2) durant 5 min. à 96°C et par la RNase T1 (2 U) durant 10 min. à 65°C dans le tampon citrate (citrate 20 mM ; EDTA 1 mM ; urée 7M ; xylène cyanol 0,05% (p/v); bleu de bromophénol 0,05% (p/v)). Le profil de fractionnement des produits des coupures enzymatiques est révélé par fluorographie après électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant à 7%.

Pour la mise en évidence des nucléotides inpliqués dans l'interaction avec le complexe SMN purifié, les ARN marqué en 3' sont d'abord soumis à une hydrolyse alcaline ménagée.
Les ARN sont renaturés 5 min à 65°C, puis 10 min à température ambiante. La RNase T1est ensuite ajoutée et son action est arrêtée après 10 min. d'incubation à 30°C, en incubant le mélange réactionnel à 4°C et en ajoutant une solution d'arrêt (EDTA 4,8 mM ; ARNt 20 µg). Un témoin sans enzyme est également réalisé afin de distinguer les coupures naturelles de l'ARN de celles générées par l'enzyme. L'arrêt des réactions est suivi d'une extraction au phénol/chloroforme puis d'une précipitation à l'ethanol à 96% en présence d'acétate de sodium 0,3 M final. Le culot d'ARN est lavé avec de l'ethanol à 70%, séché, puis repris dans du bleu de formamide. Une hydrolyse statistique de l'ARN est réalisée comme indiqué précédemment.

Pour l'étude de la structure d'ARN transcrits in vitro et non marqués radioactivement, le mélange réactionnel suivant est réalisé :

Transcrit froid	1 pmol
ARNt de levure	2 µg
Tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; $MgCl_2$ 2,5 mM ; KCl 100 mM)	qsp 40 µl

Les ARN sont renaturés 5 min. à 65°C, puis 10 min. à température ambiante. Les enzymes T1 (1 et 2U), T2 (1 et 2U) ou V1 (0,02U et 0,04U) sont ensuite ajoutées et leur action est arrêtée après 10 min. d'incubation à 30°C, par incubation du mélange réactionnel à 4°C et ajout d'une solution d'arrêt (EDTA 4,8 mM ; ARNt 20 µg). Un témoin sans enzyme est également réalisé afin de distinguer les coupures naturelles de l'ARN de celles générées par l'enzyme.

L'arrêt des réactions est suivi d'une extraction au phénol/chloroforme puis d'une précipitation à l'ethanol à 96% en présence d'acétate de sodium 0,3 M final. Le culot d'ARN est lavé avec de l'ethanol à 70%, séché, puis repris dans de l'eau stérile. Le profil de fractionnement des produits des coupures enzymatiques est révélé par extension d'amorce sur 1 µl d'ARN clivés comme décrit ci-après.

• Analyse par extension d'amorce *(Figure 42)*

Marquage de la sonde

ATP [γ^{32}P] (GE Healthcare, 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)	10 µCi
Oligonucléotide à marquer	15 pmol
Tampon de phosphorylation 10X (Tris/HCl 0,5 M, pH 7,6 ; $MgCl_2$ 100 mM ; DTT 50 mM ;Spermidine 1 mM ; EDTA 1 mM)	
T4 polynucléotide kinase (MBI Fermentas)	10 U
H_2O stérile	qsp 10 µl

Le mélange réactionnel est incubé 45 min. à 37°C. Les amorces marquées sont purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant à 10%, éluées une nuit à 37°C dans un tampon d'élution (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*) et précipitées comme décrit précédemment. Les amorces sont ensuite reprises dans de l'eau stérile à 100 cps/µl.

Hybridation de l'amorce

Oligonucléotide marqué	100 cps
Transcrit	1 µl
Tampon de l'enzyme AMV 10X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 ; KCl 40 mM ; $MgCl_2$ 6 mM)	
H_2O stérile	qsp 2,5 µl

Incubation 10 min. à 65°C, puis 10 min. dans la glace.

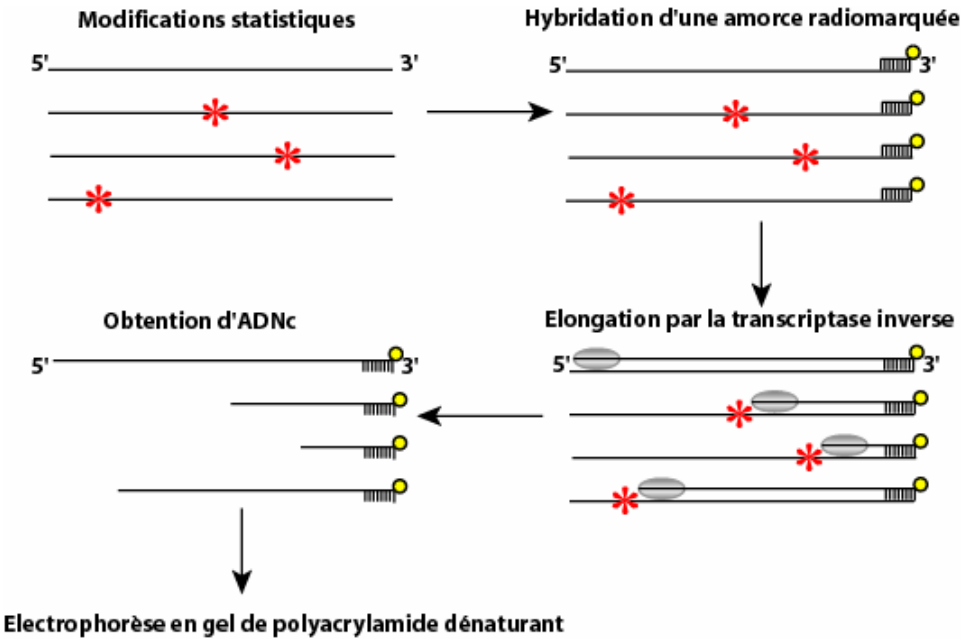


Figure 42 : Principe de la cartographie chimique ou enzymatique des ARN

Stratégie expérimentale pour l'identification des coupures ou des modifications de l'ARN par élongation d'amorce par la transcriptase inverse. Les étoiles de couleur rouge représentent les modifications ou les coupures statistiques générées dans l'ARN. Les ronds jaunes représentent l'extrémité 5' marquée radioactivement de l'amorce. La transcriptase inverse est schématiquement représentée par des cercles de couleur grise.

Elongation et séparation

dNTP	5 mM de chaque
Tampon de l'enzyme AMV 10X (voir ci-dessus)	
AMV Réverse transcriptase (Quantum Appligene)	20 U
H_2O stérile	qsp 2,5 µl
Pour un séquençage, ajouter l'un des ddNTP	0,5 mM

Le mélange est incubé 30 min. à 42°C et la réaction est arrêtée par l'ajout de bleu de formamide (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*). Les échantillons sont chauffés 2 min. à 96°C, puis plongés dans la glace avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 7%.

4.3/ Analyse de la structure secondaire d'UN ARN en solution par utilisation de sondes chimiques

Le DMS (Diméthyl Sulfate) (Aldrich, 10,6 M) est un agent chimique qui méthyle l'adénine en position N-1, la cytosine en position N-3 et la guanine en position N-7 ***(Figure 41)***. Le CMCT (N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-Méthylmorpholino)-éthyl] Carbodiimid-4-Toluonosulfonate) (Flukachemika) modifie les positions N3-U et à un plus faible degré N1-G, et le kéthoxal forme un pont entre les positions N1-G et N2-G ***(Figure 41)***.

Pour l'étude de la structure d'ARN transcrits in vitro, le mélange suivant est réalisé :

Transcrit froid	1 pmol
ARNt de levure	2 µg
Tampon de réaction 10X*	
H_2O stérile	qsp 40 µl

*Le tampon de réaction dépend du réactif chimique utilisé. Dans le cas du DMS et du kéthoxal, le tampon cacodylate 10X est ajouté (cacodylate de Na 500 mM, pH 7,5 ; KCl 1 M ;

$MgCl_2$ 25 mM), et dans le cas du CMCT, le tampon borate 10X est utilisé (borate de Na 500 mM, pH 8 ; KCl 1 M ; $MgCl_2$ 25 mM).
Le mélange est incubé 8 min. à 30°C. Les agent modifiant ont été ajoutés dans les conditions suivantes : kéthoxal (1,8 µg/µl et 4,6 µg/µl), DMS (0,25 µl et 0,5 µl), CMCT (8,4 µg/ µl et 21 µg/µl). La réaction est réalisée pendant 8 min. à 30°C dans le cas des modifications au DMS et au CMCT et pendant 10 min. dans le cas des modifications au kéthoxal. La réaction est arrêtée par l'ajout du tampon G stop (Tris-acétate 1 M, pH 7,5 ; acétate Na 1,5 M ; β-mercapto-ethanol 1 M ; EDTA 0,1 mM) dans le cas des modifications au DMS, par l'ajout de borate de potassium 0,5 M dans le cas des modifications au CMCT. Pour les 3 types de réaction, l'acétate de sodium 0,3 M est ajouté après l'extraction des ARN par un mélange phénol/chloroforme de façon à les précipiter dans l'ethanol 96% en présence de 1 µg de glycogène. Les ARN modifiés sont repris dans de l'eau stérile.

L'analyse des modifications chimiques, par extension d'amorce, est réalisée sur 1 µl d'ARN comme décrit dans le paragraphe précédent (cf. *4.2/ Analyse de la structure secondaire d'ARN en solution par utilisation de sondes enzymatiques (Figure 43)*). Pour chaque condition, un témoin sans agent modifiant est réalisé.

4.4/ Recherche de modèles de structure secondaire : utilisation du logiciel Mfold

Ce logiciel, fourni par le Genetics Computer Group de l'Université de Madison (USA), est basé sur le programme de recherche de structures secondaires et a été établi par Jaeger *et al.* (Jaeger et al, 1989). Ce logiciel tient compte des estimations de la stabilité thermodynamique des appariement de bases de l'ARN à 0°C dans une solution de NaCl 1M. L'intérêt d'utiliser la version Squiggles est de pouvoir imposer, au cours de la recherche d'une structure secondaire potentielle, des contraintes de structuration en simple et double brin, correspondant aux données acquises expérimentalement. Ce logiciel est disponible à l'adresse suivante : http://mfold.bioinfo.rpi.edu/.

5/ Production de protéines recombinantes et analyse des interactions proteines/protéines in vitro

5.1/ Production de protéines recombinantes chez E. coli

• Transformation des bactéries

Des bactéries *E. coli* BL21(DE3) pLysS (cf. I/ Matériels *1/ Les souches et plasmides utilisés*) sont transformées avec 10 à 20 ng de plasmides de type pET28-b (étiquette histidine) ou pGEX (fusion GST) portant les séquences codant les protéines à produire.

• Culture bactérienne

Les bactéries sont cultivées dans le milieu LB (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*) en présence d'un antibiotique de sélection. La production de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (1 M) dans le milieu de culture.

• Purification des protéines fusionnées à une étiquette

• Préparation des extraits bactériens

Les cultures sont centrifugées 10 min. à 4.000 rpm et les culots sont lavés 2 fois avec du tampon PBS (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*). Après le second lavage, le culot est repris dans 20 ml de tampon de lyse (RSB 100/1% Triton/Inhibiteur de protéase). La solution est ensuite soumise à une sonication (4 fois 1 min., Duty Cycle 50%, Output 5 entrecoupé d'arrêt de 1 min. dans la glace) puis centrifugée 8 min. à 10.000 rpm.

• Préparation des billes

500 µl de billes Ni-NTA Agarose (Qiagen) sont utilisées pour la production de protéines étiquetées histidine et 500 µl de billes de glutathion couplée à la G-sépharose (Amersham Biosciences) pour la production de protéines fusionnées à la GST. Ces billes sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse sans inhibiteurs de protéases.

• Incubations des extraits bactériens avec les billes

Les extraits sont ajoutés aux billes et incubés en rotation pendant 1 à 2 h. à 4°C. Après incubation, les billes sont lavées 3 fois avec du tampon PBS.

Les protéines fixées aux billes sont conservées à -20°C dans une solution PBS/glycérol 50% (v/v).

• Elution et dialyse

◘ Les protéines portant une étiquette histidine sont éluées par traitement des billes avec 500 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; Imidazole 250 mM) sous agitation pendant 10 min. Deux élutions successives sont réalisées. Les élutions sont réunies et dialysées contre 2 l de tampon de reconstitution (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; KCl 50 mM ; $MgCl_2$ 5 mM ; EDTA 0,2 mM glycérol 10% (v/v)) sous agitation pendant une nuit à 4°C.

◘ Les protéines fusionnées à la GST sont éluées par traitement des billes avec 200 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; KCl 150 mM ; Glutathion 50 mM) sous agitation pendant 10 min. Quatre élutions successives sont réalisées. Les quatre élutions sont réunies et dialysées contre 2 l de tampon de reconstitution (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; KCl 50 mM ; $MgCl_2$ 5 mM ; EDTA 0,2 mM glycérol 10% (v/v)) sous agitation pendant une nuit à 4°C.

• Clivage des protéines de fusion

La GST est clivée de la protéine de fusion dans le tampon de coupure (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; $CaCl_2$ 2,5 M ; DTT 1 mM) en présence de thrombine (5 U, Novagen) pendant une nuit à température ambiante.

• Estimation de la qualité de la protéine produite

La qualité et la quantité des protéines produites est estimée en déposant des quantités variables de protéines sur gel SDS-PAGE en parallèle d'une protéine de concentration connue (BSA, New England Biolabs). Les protéines sont ensuite révélées par coloration au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25%, ethanol 50% et acide acétique 10%).

5.2/ Production de protéines recombinantes dans un lysat de réticulocytes de lapin ou dans un extrait d'E.coli

La protéine SMN et ses mutant, les protéines Gemin 2 à 8, unrip, la protéine FMRP et ses mutant, les protéines FXR1P, FXR2P, snurportin-1 et Sm B sont produites en présence de [^{35}S] méthionine ou de [^{35}S] cyctéine (GE Healthcare, 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) dans un lysat de réticulocytes de lapin ou dans un extrait d'*E. coli* selon les recommandations du fabricant (Promega). Pour inhiber la méthylation des arginines, le lysat de réticulocytes de lapin est préalablement incubé avec des concentrations variables d'inhibiteur de méthylation : S-adenosyl-L-homocysteine (250 µM et 500 µM) (SAH, Sigma) à température ambiante pendant 10 min avant l'ajout de la matrice ADN.

5.3/ Analyse des interaction protéines/protéines in vitro

Pour toutes les expériences d'interaction protéines/protéines réalisées, *in vitro*, 4 µg de protéines fusionnées à la GST et fixées à des billes de G-sépharose couplées au glutathion ou étiquetées histidine et fixées à des billes Ni-NTA Agarose sont utilisés. Ces protéines sont incubées avec des protéines produites dans un lysat de réticulocytes de lapin ou dans un extrait d'*E. coli*, comme indiqué précédemment dans le tampon RSB 200 contenant 0,05% d'Igepal, ou incubées avec le complexe SMN dans le tampon RSB 100 contenant 0,02% d'Igepal pendant 2 h. à 4°C. Pour chaque expérience, la RNase A (0,2 mg/ml) est préalablement ajoutée au produit de traduction et incubée pendant 15 min à 30°C. Après incubation, les billes sont lavées 5 fois dans le tampon d'incubation et les protéines fixées sont éluées en ajoutant 20 µl de bleu de dépôt SDS-PAGE (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), glycérol 20%, 3.7 M β-mercaptoethanol) et en chauffant 6 min à 96°C. Les protéines sont ensuite analysées par électrophorèse en gel SDS-PAGE suivie d'une fluorographie ou par Western-Blot.

6/ Techniques d'analyse des interactions ARN/protéine(s)

6.1/ Analyses de complexes ARN/protéines par expérience de retard sur gel

La formation d'un complexe entre un ARN et une protéine peut être visualisée par un retard de migration de l'ARN complexé par rapport à l'ARN libre sur un gel natif. Pour cela, un ARN marqué à homogénéité est produit par transcription *in vitro* (cf. II/ Méthodes, *4.1/ Préparation des ARN*).

• Formation des complexes ARN/protéine recombinante

Après renaturation des ARN 5 min. à 65°C, puis 15 min. à température ambiante, les complexes ARN/protéine sont formés dans le tampon de retard sur gel (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; NaCl 80 mM ; $MgCl_2$ 8 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 1 mM ; glycérol 15% (v/v)) en incubant 45 min. à 4°C, 5 fmol d'ARN marqués à uniformité en présence de concentrations croissantes en protéines (de 0 à 2 µM), et de 1,5 µg d'ARNt de levure (Roche Molecular Biochemicals). Le mélange réactionnel suivant est réalisé :

ARN radioactif (5 fmol)	5000 cpm
Tampon de retard sur gel (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9 ; NaCl 80 mM ; $MgCl_2$ 8 mM ; EDTA 1 mM ; DTT 1 mM ; glycérol 15% (v/v))	
ARNt de levure	1,5 µg
H_2O	qsp 15 µl

Ajout de protéine à la concentration souhaitée.

• Formation de complexes ARN/protéines dans un extrait cellulaire total

Après renaturation des ARN 5 min. à 65°C, puis 15 min. à température ambiante, les complexes ARN/protéines sont formés dans le tampon RSB 100 (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*) en incubant 30 min. à 4°C, 5 fmol d'ARN marqué uniformément en présence de concentrations croissantes d'extrait total de cellules HeLa, de 1 µg d'ARNt de levure (Roche Molecular Biochemicals), d'ATP (3 mM)et de $MgCl_2$ (4 mM). Le mélange réactionnel suivant est réalisé :

ARN radioactif (5 fmol)	5000 cpm
RSB 100	10 µl

ARNt de levure	1,5 µg
ATP	50 mM
RNasin (Amersham)	26,2 U
H_2O	qsp 16 µl

1 ou 2 µl d'extrait total de cellules HeLa est ajouté à ce mélange.

• Fractionnement par électrophorèse en gel natif

Du bleu CSB (cf. I/ Matériels *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*) est ajouté au mélange réactionnel ayant servi à former les complexes. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide natif 6% (acrylamide/bisacrylamide 38/2), en présence de glycérol 0,5% et de TBE 0,5X. L'électrophorèse est réalisée à 100 V/cm et à 4°C. Ainsi, les complexes [ARN/protéine] formés sont retardés dans leur migration par rapport aux ARN libres.

6.2/ Analyses des interactions ARN/complexe SMN

6.2.1/ Analyses à partir du complexe SMN purifié

• Purification du complexe SMN

Le complexe SMN est purifié comme décrit précédemment (cf. II/ Méthodes, *3/ Purification des complexes SMN*). Chaque purification permet de réaliser deux analyses d'interaction entre le complexe SMN et les ARN.

• Incubation du complexe SMN fixé aux billes avec les ARN

Après avoir divisé les billes en deux lots, le mélange réactionnel suivant est réalisé :

Complexe SMN purifié sur billes	
RSB 100 + 0,01% d'Igepal	50 µl
ARNt de levure	15 µg

20.000 cpm d'ARN marqués à homogénéité, produits par transcription *in vitro* (cf. II/ Méthodes, *4.1/ Préparation des ARN*) et préalablement renaturés 5 min. à 65°C, puis 15 min. à température ambiante, sont ajouté.

Le mélange est incubé pendant 30 min. à 4°C sous agitation. L'incubation est suivie par 3 lavages rapides avec le tampon RSB 100 contenant 0,01% d'Igepal.

• Elution et analyse des ARN

Les transcrits sont élués par un traitement de 45 min. à température ambiante avec la protéinase K (20 mg/ml) (Roche) dans 300 µl de tampon PK (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; EDTA 25 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,3 M ; SDS 2% (v/v)), suivie d'une extraction au phénol. Les ARN sont ensuite précipités comme décrit précédemment et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 10%, suivie d'une fluorographie.

6.2.2/ Analyses par RT-PCR

• Principe

A partir d'un extrait total de cellules SH-SY5Y, le complexe SMN est immunosélectionné grâce à un anticorps (2B1) dirigé contre la protéine SMN (cf. Tableau VIII). Un mélange d'anticorps issus de souris non immunisées (SP2/O) est utilisé comme contrôle négatif (cf. Tableau VIII).

• Préparation des billes

Pour une réaction d'immunosélection, 30 µl de billes G-sépharose (Sigma) sont lavées 3 fois avec le tampon RSB 250 contenant 0,05% d'Igepal et incubées sous agitation 1h. à 4°C avec 8 µl d'anticorps 2B1 ou 5 µl d'anticorps SP2/O dans 500 µl de tampon RSB 250 contenant 0,05% d'Igepal. Les billes sont ensuite lavées 3 fois dans le même tampon afin d'éliminer les anticorps non fixés aux billes.

• Préparation des extraits totaux et immunosélection

Un extrait total est préparé dans le tampon de RSB 250 contenant 0,05% d'Igepal et filtré (0,22 µm). 5% de l'extrait cellulaire sont conservés pour être directement fractionnés par électrophorèse. Les billes sont ensuite incubées avec le reste de l'extrait pendant 2h. sous agitation à 4°C, puis lavées dans le tampon RSB 250 contenant 0,02% d'Igepal.

• Elution et analyse des ARN

Après immunosélection, les ARN fixés au complexe SMN sont élués par un traitement de 45 min. à température ambiante avec la protéinase K (20 mg/ml) (Roche) dans 300 µl de tampon

PK (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; EDTA 25 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,3 M ; SDS 2% (v/v)), suivie d'une extraction au phénol. Les ARN sont ensuite précipités et analysés par RT-PCR.

Conversion des ARN sélectionnés en ADN complémentaires par RT-PCR

Hybridation de l'oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 3' des ARN sélectionnés

ARN sélectionnés (voir ci-dessus)	5 µl
Oligonucléotide 3'	0,5 µg
Tampon AMV 10X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 ; KCl 40 mM ; $MgCl_2$ 6 mM)	
H_2O	qsp 15 µl

Le mélange réactionnel est incubé 10 min. à 65°C puis refroidi dans la glace.

Réaction de transcription inverse

Mélange réactionnel précédent	15 µl
dNTP	5 mM de chaque
Tampon AMV 10X (voir ci dessus)	
AMV Réverse transcriptase (Quantum Appligene)	5 U
H_2O	qsp 10 µl

Le mélange réactionnel est incubé 45 min. à 42°C.

Amplification des ADN complémentaires synthétisés

Mélange réactionnel précédent	2 µl
Oligonucléotide 5' ***(tableau IX)***	100 ng
Oligonucléotide 3'***(tableau IX)***	150 ng
Tampon DyNAzyme 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,8 ; KCl 50 mM ; Triton X-100 0.1 %)	
dNTP	5 mM de chaque
DyNAzyme (Finnzymes)	2 U
H_2O	qsp 50 µl

Numéro	Séquence 5' vers 3'	Informations complémentaires
3929	TTGTTGCTTTGAGGGAAAGTTACGCTTAT	Complémentaire aux nucléotides 158-185 de l'ARN BC200
2943	ATAAAAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGCCGGGC GCGGTGGCTCA	Identique aux nucléotides 1-19 de l'ARN BC200
HUISm	AGTCCCCCACTACCACAAATT	Complémentaire aux nucléotides 145-125 du snRNA U1
3514	GGGAGATACCATGATCACGAA	Identique aux nucléotides 16-36 du snRNA U1
550	GTGTCATCCTTGCGCAGGGG	Complémentaire aux nucléotides 60-79 du snRNA U6
3513	CGCTTCGGCAGCACATATAC	Identique aux nucléotides 6-25 du snRNA U6

Tableau IX : oligonucléotides utilisés pour les expériences de RT-PCR

Le mélange est soumis au programme PCR suivant :

Dénaturation : 4 min à 94°C

Dénaturation : 30 sec à 94°C
Hybridation : 1 min à 60°C
Elongation : 2 min à 72°C
} cycle reproduit 29 fois

Terminaison : 5 min à 72°C

Les produits PCR amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1% après l'ajout de bleu de dépôt agarose (6X) (cf. I/ Matériels, *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*).

6.2.3/ Technique de micro-injection dans les oocytes de X. Laevis

• **Produits et solutions**

- Phénoxy-ethanol (Sigma)
- Collagénase (Sigma)
- Solution OR-2 10X sans Ca^{2+}

NaCl	825 mM
KCl	25 mM
$MgCl_2, 6H_2O$	10 mM
Na_2HPO_4	10 mM
HEPES-KOH	50 mM, pH 7,8

• **Mode opératoire**

La femelle est endormie dans une solution de phénoxy-ethanol à 2 mg/ml. Elle est ensuite ouverte au scalpel sur le coté droit ou gauche en position ventrale de façon à faire sortir un ou deux lobes d'oocytes des ovaires. La femelle est finalement recousue et réveillée sous l'eau courante. Les sacs ovariens sont ouverts et placés dans la solution OR-2 supplémentée avec 1 mM de $CaCl_2$ jusqu'au traitement par la collagénase. Afin de défolliculer les oocytes, les sacs ovariens sont traités avec 5000 U de collagénase préparée dans la solution OR-2 sans calcium pendant 30 min. Les sacs ovariens sont ensuite rincés dans la solution OR-2 supplémentée

avec 1 mM de $CaCl_2$ afin d'inhiber l'action de la collagénase. Les ovocytes sont ensuite extraits de leur enveloppe de cellules folliculaires à l'aide de pinces fines. Les oocytes sont finalement stockés à 16°C dans la solution OR-2 supplémentée avec 1 mM de $CaCl_2$ jusqu'à leur utilisation.

• Micro-injection

• Préparation des ARN à injecter

ADN à transcrire (plasmide linéarisé)	1 µg
Tampon de transcription 5X (HEPES-KOH 400 mM, pH7,5 ; $MgCl_2$ 120 mM ; spermidine 10 mM ; DTT 200 mM)	
rNTP (rATP, rCTP, rGTP)	10 mM de chaque
UTP	0,5 mM
αUTP [^{32}P] (GE Healthcare, 3000 Ci/mmol)	10 µCi
RNasin (RNA guard Pharmacia Biotech)	35,7 U
T7 RNA polymérase (Promega)	2 U
H_2O	qsp 15 µl

Le mélange est incubé 2 h. à 37°C. Les transcrits sont purifiés sur colonnes G25 de 1 ml ("mini Quick Spin Oligo Colums", Roche), puis précipités sans glycogène. Les ARN sont ensuite repris dans 4 µl d'eau stérile et dilués à 100.000 cpm/µl.

• Micro-injection des ARN et des anticorps

Les injections des ARN sont réalisées dans le noyau des oocytes et l'injection des anticorps dans le cytoplasme. Le volume d'injection est de 19,4 nl/oocytes. Avant injection, les oocytes sont centrifugés 15 min. à 1.000 rpm afin de faire remonter le noyau à la surface de pôle animal des oocytes. Les injections sont réalisées grâce à un injecteur Nanoject (Drummond). Après injection, les oocytes sont incubés à 16°C.

• Dissection des oocytes et préparation des fractions nucléaires et cytoplasmiques

Après incubation, les oocytes sont disséqués dans le tampon RSB 100-G (RSB100 contenant 10% de glycérol (v/v)) afin de séparer le noyau (fraction nucléaire : FN) du cytoplasme (fraction cytoplasmique : FC) des oocytes. Les fractions sont ensuite homogénéisées dans 400

µl de tampon RSB 150 et centrifugées 10 min à 10.000 rpm. Les surnageant servent ensuite pour les expériences d'immunsélection.

• Préparation des billes et immunosélection

Les billes sont préparées comme décrit précédemment et incubées avec les fractions nucléaires, cytoplasmiques ou totales pendant 1 h. à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois dans le tampon RSB 150 (cf. I/ Matériels, *2/ Milieux de culture, tampons et solutions d'usage courant*).

• Elution et analyse des ARN

Les ARN fixées aux billes sont élués par un traitement de 45 min. à température ambiante avec la protéinase K (20 mg/ml) (Roche) dans 300 µl de tampon PK (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; EDTA 25 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,3 M ; SDS 2% (v/v)), suivie d'une extraction au phénol. Les ARN sont ensuite précipités et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 10%, suivie d'une fluorographie.

Résultats - Perspectives

Résultats-Perspectives

Cette partie sera divisée en trois chapitres. Je décrirai tout d'abord la mise en évidence d'une interaction entre les protéines SMN et FMRP *(Publication)*. J'expliciterai ensuite les résultats que j'ai obtenus sur l'ARN BC200 : (i) l'étude de sa structure secondaire, (ii) son interaction avec le complexe SMN et (iii) les résultats préliminaires de son interaction avec la protéine hnRNP-A2. Dans le troisième et dernier chapitre, je décrirai les différents résultats qui nous permettent d'émettre l'hypothèse d'un rôle du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP. Les données obtenues et les perspectives d'études qu'ouvrent mes travaux seront discutées séparément pour chacun de ces volets de recherche.

Chapitre I : Mise en évidence et caractérisation d'une interaction entre le complexe SMN et la protéine FMRP

I/ Intérêt de l'étude dans le contexte actuel des connaissances

Comme décrit en introduction et dans la description des objectifs, un grand nombre de granules se déplacent dans les axones et les dendrites. Ces granules contiennent des ARNm dont la traduction est réprimée. Les protéines SMN et FMRP ont été observées dans certains de ces granules, mais aucun lien ni physique, ni fonctionnel n'avait été postulé jusque là ; probablement parce que la déficience en l'une ou l'autre de ces protéines ne conduit pas au même type de pathologie. Néanmoins, différentes observations suggèrent un rôle possible de la protéine SMN et peut-être du complexe SMN, dans l'assemblage, le transport et la traduction des ARNm dans les neurones (pour revues, Monani, 2005 ; Briese et al, 2005 ; Pellizzoni, 2007). La protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), dont l'absence provoque le syndrome de l'X fragile, une des formes héréditaires la plus fréquente de retard mental, est connue pour être impliquée dans la régulation de la traduction (pour

revue, Bardoni et al, 2006). La participation de ces deux protéines dans ces processus soulevait la question de leur interaction possible. Par ailleurs, on peut supposer que l'intégrité des granules véhiculés par les molécules moteurs, dans les axones et les dendrites, repose sur des interactions protéines/protéines et ARN/protéines. Comme décrit en introduction, la composition de ces granules reste encore mal connue. Il nous a donc paru intéressant de tester si la protéine FMRP pouvait interagir directement avec la protéine SMN sous forme isolée ou au sein du complexe SMN. Ce travail est présenté sous forme de publication, mais nous détaillerons, en introduction de l'article, notre stratégie expérimentale, en détaillant certaines expériences non décrites dans l'article.

II/ Stratégie utilisée pour étudier l'interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN

1/ Recherche de l'association du complexe SMN avec la protéine FMRP dans des extraits de cellules neuronales

Il fallait tout d'abord tester à partir d'extraits cellulaires si l'hypothèse d'une interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN dans des cellules neuronales était possible. Dans ce but, la protéine FMRP contenant une étiquette Flag a été exprimée de manière transitoire dans des cellules de neuroblastomes humains SH-SY5Y. A partir de ces cellules, des extraits totaux ont été préparés et nous avons testé l'association de la protéine Flag-FMRP avec le complexe SMN par immunosélection à l'aide d'anticorps anti-Flag ***(Figure 1 A/, article page 181)***. Afin de s'assurer que cette interaction n'était pas liée à une surexpression de la protéine Flag-FMRP, nous avons, ensuite, vérifié l'existence d'une interaction entre la protéine FMRP endogène et le complexe SMN, par des expériences de co-immunosélection à l'aide d'extraits totaux d'une lignée cellulaire dérivant de motoneurones de souris en culture (lignée MN1, (Salazar-Grueso et al, 1991) et de l'anticorps 7G1 spécifique de la protéine FMRP (fourni par l'équipe de S.T. Warren Atlanta, USA) ***(Figure 1 B/, article page 181)***. Dans cette dernière expérience, seule la co-immunosélection des protéines SMN, Gemin 2 et Gemin 8 avec la protéine FMRP endogène a pu être testée, car les anticorps contre les autres protéines humaines du complexe SMN ne reconnaissent pas les

protéines murines. Les résultats de ces deux expériences nous ont permis de montrer qu'au moins une fraction des complexes SMN interagit avec la protéine FMRP dans des cellules neuronales en culture.

Il est également à noter que le même type d'expérience a été réalisé avec des cellules HEK 293, et que la détection d'une telle interaction n'a pas été reproductible *(résultats non illustrés)*. Dans certains cas, les protéines du complexe SMN étaient co-immunosélectionnées avec la protéine FMRP et dans d'autres non. Ces expériences ont été répétées de nombreuses fois sans qu'il ait été possible de conclure. L'interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN semble donc plus fréquente et constante dans les cellules neuronales par rapport aux autres types cellulaires. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle spécifique de ces deux protéines dans les neurones.

2/ Mise en évidence d'une co-localisation partielle entre les protéines SMN et FMRP dans des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture

Après la mise en évidence d'une interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN dans des extraits de cellules neuronales, il était important d'analyser leur localisation par imagerie. Dans le cadre de la collaboration que nous avons établie, F. Rage (IGMM, Montpellier, France) a donc étudié la localisation des protéines étiquetées GFP-FMRP et SMN-RFP, exprimées de manière transitoire dans des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture. Comme attendu, ces deux protéines se distribuent dans des granules dans le corps cellulaire des neurones et dans les prolongements neuritiques. De manière très intéressante, F. Rage a observé, à la fois dans le corps cellulaire du neurone et dans les prolongements neuronaux, des granules contenant la protéine SMN mais pas la protéine FMRP, des granules contenant la protéine FMRP mais pas la protéine SMN et des granules contenant les deux protéines ***(Figure 2, article page 182)***. Ces résultats suggèrent que des fractions de ces deux protéines puissent être transportées ensemble le long des neurites. Ils soulignent, aussi, l'hétérogénéité de la composition des granules contenant la protéine SMN.

Une forte surexpression des protéines SMN ou FMRP induit la formation et l'accumulation de granules de stress (Mazroui et al, 2002 ; Hua & Zhou, 2004). Il était donc

très important de vérifier que les granules observés n'étaient pas des granules de stress. Ainsi, F. Rage a analysé, par immunofluorescence, la localisation d'un marqueur des granules de stress : la protéine G3BP (*Ras-GTPase activating protein (GAP) SH3 domain-binding protein*), avec ou sans surexpression de l'une ou l'autre des protéines SMN-RFP ou GFP-FMRP. Une distribution cytoplasmique et diffuse de la protéine G3BP a été observée dans les deux cas, démontrant l'absence de granules de stress dans les conditions expérimentales utilisées ***(Supplementary data, article page 191)***. Nous pouvons donc conclure que dans les neurones, les protéines SMN et FMRP peuvent être co-localisées dans des granules différents des granules de stress.

3/ Etude de l'interaction entre le complexe SMN purifié et la protéine FMRP recombinante

Nous avions montré une interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN dans les cellules neuronales. Cependant, à ce stade de notre expérimentation, nous ne savions pas si elle était directe ou non. Dans le but de répondre a cette question, nous avons purifié le complexe SMN et testé son association avec la protéine FMRP recombinante.

3.1/ Etablissement d'une lignée cellulaire stable pour la purification du complexe SMN

L'équipe de G. Dreyfuss a mis au point une méthode de purification très efficace reposant sur l'utilisation de lignées de cellules HeLa exprimant de manière stable, soit la protéine SMN soit la protéine Gemin 2, toutes les deux avec une étiquette Flag à leur extrémité N-terminale (Flag-SMN ou Flag-Gemin2) (Pellizzoni et al, 2002a). L'étiquette Flag, composée d'un peptide de neuf acides aminés (DYKDDDDK), est liée à la protéine par une glycine. Par cette technique, il est alors possible de purifier le complexe SMN, à partir d'un extrait cellulaire, en utilisant des anticorps anti-Flag immobilisés sur billes d'agarose. L'équipe de G. Dreyfuss ne souhaitant pas distribuer à d'autres laboratoires les lignées cellulaires qu'elle possède, au cours de mon D.E.A., j'ai donc réalisé une lignée exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2.

Il existe de multiples systèmes qui permettent d'intégrer dans le génome de cellules eucaryotes en culture une séquence codant un gène que l'on veut exprimer de manière contrôlée (pour revue, Makrides, 1999). Notre choix s'est porté sur le système Tet-Off commercialisé par Clontech. Dans ce système, les cellules HeLa expriment de manière stable la protéine tTA, un activateur de transcription dont l'activité dépend de la présence de tétracycline dans le milieu de culture ***(Figure 43 A/)***. Dans ces cellules, il est donc possible de réguler l'expression d'un gène d'intérêt si celui-ci est placé sous le contrôle d'un promoteur portant l'élément TRE (*Tetracycline Response Element*) reconnu par le facteur tTA ***(Figure 43 A/)***.

Ces cellules ont été co-transfectées avec le plasmide pTRE2, dans lequel avait été cloné l'ADNc codant la protéine de fusion Flag-Gemin2 placé sous le contrôle du promoteur P_{min}CMV (pTRE2-FlagGemin2), et le plasmide pTK-Hyg portant un gène de résistance à l'hygromycine qui est utilisé pour la sélection ***(Figure 43 B/)***. Dans la réaction de transfection, le plasmide pTRE2-FlagGemin2 est apporté en excès par rapport au plasmide pTK-Hyg, afin que la majorité des cellules transfectées par le plasmide pTK-Hyg le soit également par le plasmide pTRE2-FlagGemin2. L'ajout d'hygromycine (200 µg/ml) nous a ensuite permis de sélectionner les clones résistants. Au total, 17 clones résistants à l'hygromycine ont été obtenus. Après vérification de l'expression de la protéine Flag-Gemin2 par la technique de Western-Blot, seuls 10 clones ont été retenus *(résultats non illustrés)*. Cependant, il est possible de perdre rapidement l'expression du gène de résistance ou du gène codant la protéine d'intérêt, s'ils sont intégrés dans une région instable du génome de la cellule hôte. Tous les clones ont, donc, été mis en culture pendant une dizaine de générations, afin de s'assurer de la stabilité de l'expression des deux gènes. Finalement, après repiquages successifs seuls deux clones (B1 et C4') exprimaient de manière stable la protéine Flag-Gemin2 à des taux voisins de celui de la protéine endogène. Nous les avons retenus.

3.2/ Purification du complexe SMN et test d'association à la protéine FMRP

Des deux lignées cellulaires B1 et C4', seule la lignée C4' a ensuite été utilisée pour purifier le complexe SMN. Cette lignée présentait, en effet, une expression un peu plus

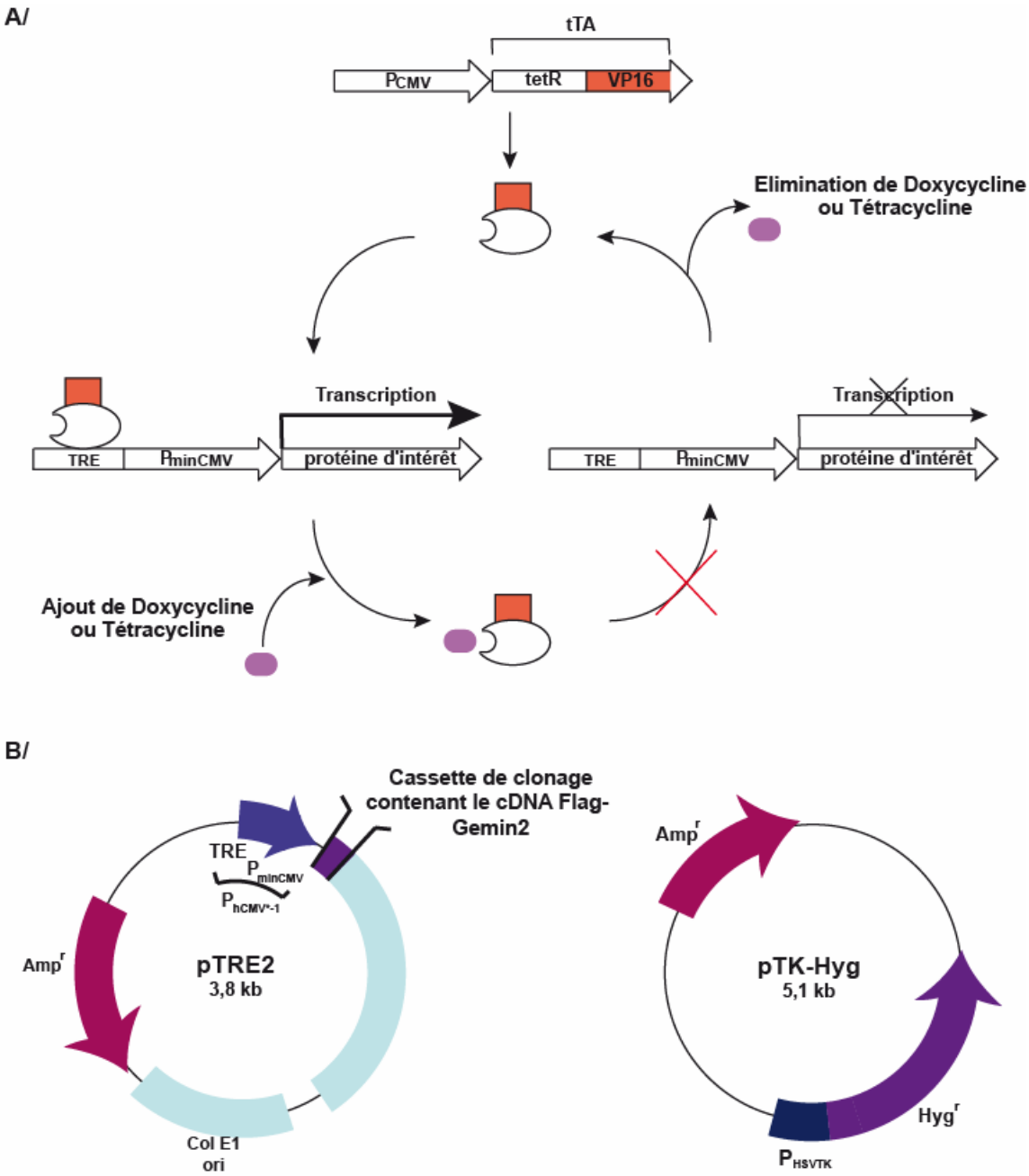


Figure 43 : Le système Tet-Off et les plasmides utilisés pour l'établissement de la lignée exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2

A/ Principe de la régulation de l'expression d'une protéine d'intérêt dans le système Tet-Off. **B/** Plasmides pTRE2 portant la construction Flag-Gemin2 et le plasmide de sélection pTK-Hyg. Abréviations : TRE : Tetracycline Response Element ; P_{CMV} : Promoteur du cytomégalovirus ; P_{minCMV} : Promoteur minimal du cytomégalovirus ; P_{hCMV} : promoteur du cytomégalovirus sous contrôle de l'élément TRE.

forte de la protéine Flag-Gemin2 que la lignée B1. Des extraits totaux ont été préparés, à partir de la lignée cellulaire C4' et incubés en présence d'anticorps anti-Flag immobilisés sur billes d'agarose, comme indiqué dans la partie *Matériels et Méthodes*. Le complexe SMN était alors retenu sur les billes, par l'intermédiaire de l'étiquette Flag située à l'extrémité N-terminale de la protéine Gemin 2. Après incubation, une série de lavages, permettant d'éliminer les composant cellulaires non fixés, ont été réalisés. L'utilisation d'une solution de lavage contenant de fortes concentrations en sels (500 mM NaCl) permet de rompre des interactions entre le complexe SMN et les protéines auxquelles il s'associe, telles que les protéines Sm (Pellizzoni et al, 2002a). Ainsi, seule la structure « cœur » du complexe SMN, à savoir la protéine SMN et les protéines Gemin 2 à 8 et unrip restait fixée aux billes. Pour contrôle, des expériences ont été réalisées, en parallèle, avec des extraits totaux de cellules HeLa n'exprimant pas la protéine Flag-Gemin2. Les protéines fixées aux billes ont, ensuite, été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE et révélées par coloration à l'argent et par Western-Blot, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Un exemple du fractionnement obtenu est illustré dans la ***figure 44 A/ et B/*** (Piazzon et al, 2008). Notre profil de fractionnement des protéines était comparable à ceux obtenus précédemment par les équipes de G. Dreyfuss et L. Pellizzoni (Yong et al, 2004a ; Carissimi et al, 2006a). La présence de la protéine Gemin 7 n'a pas pu être testée par Western-Blot, car nous n'avons malheureusement pas d'anticorps reconnaissant cette protéine à notre disposition. L'absence des protéines associées au complexe SMN, telles que les protéines Sm, ainsi que l'absence des protéines particulièrement abondantes dans les cellules, telles que les protéines hnRNP-A1, C1/C2, révèlent un haut degré de pureté du complexe purifié. Dans ces conditions, le complexe SMN purifié ne contient pas non plus d'ARN.

Nous avons, ensuite, élué le complexe SMN fixé aux billes par l'ajout d'un excès de peptides Flag, et montré son association à la protéine recombinante de fusion GST-FMRP, fixée sur des billes de sépharose couplées à du glutathion, fournie par H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France) ***(Figure 3C/, article page 183)***.

Les données obtenues ont permis, non seulement, de confirmer l'interaction de la protéine FMRP avec le complexe SMN mais suggèrent, de plus, que cette interaction est directe.

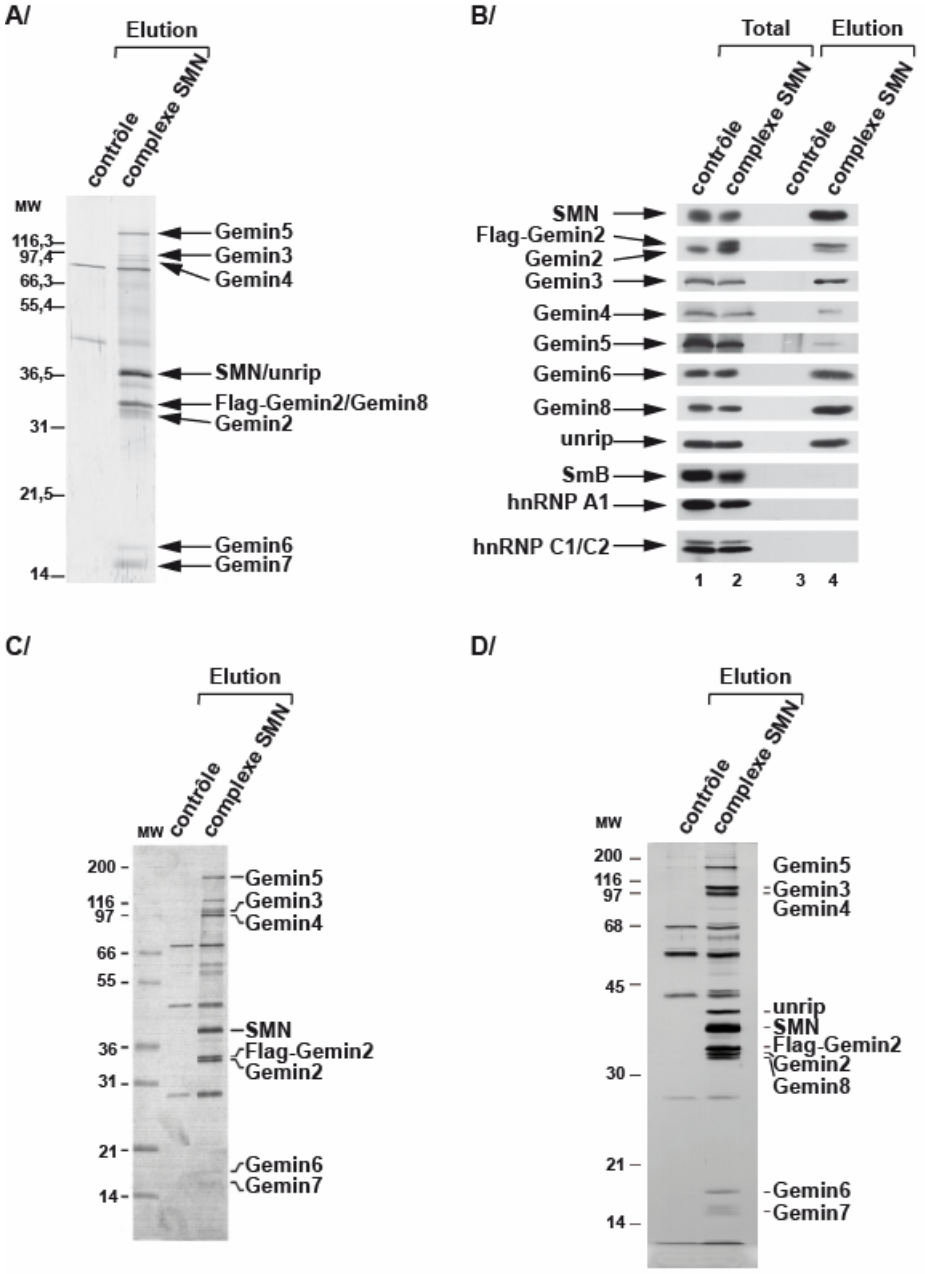


Figure 44 : Purification du complexe SMN

Comparaison du profil de fractionnement des protéines du complexe SMN purifié à partir de la lignée cellulaire C4' par rapport aux profils décrits dans la littérature. **A/** Profil de fractionnement des protéines obtenu par coloration à l'argent selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes* (Piazzon et al, 2008). **B/** Analyse des constituants du complexe SMN purifié par Western-Blot (Piazzon et al, 2008). **C/** et **D/** Profils de fractionnement des protéines obtenus par coloration à l'argent par Yong et al, 2004a et par Carissimi et al, 2006a.

4/ Identification de la protéine du complexe SMN interagissant avec la protéine FMRP

Afin de définir quelle(s) protéine(s) au sein du complexe SMN interagit avec la protéine FMRP, chacune des protéines du complexe SMN a été produite, par transcription/traduction, dans des extraits de réticulocytes de lapin. Nous avons ensuite analysé leur interaction avec la protéine recombinante de fusion GST-FMRP, fixée à des billes de G-sépharose couplées au glutathion, que nous avait fourni H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France). Nous avons montré que seule la protéine SMN, parmi les 9 protéines du complexe SMN, a la capacité de s'associer avec la protéine GST-FMRP, *in vitro* ***(Figure 4, article page 184)***. Comme les protéines du complexe SMN étaient produites dans des extraits de réticulocytes de lapin, nous ne pouvions pas exclure la possibilité que l'interaction observée soit médiée par d'autres protéines. Aussi, pour s'assurer que l'interaction était bien directe, l'association entre les protéines SMN et FMRP a également été testée en produisant la protéine SMN par transcription/traduction dans des extraits d'*E. coli* ***(Figure 45)***. En effet, ces extraits ne sont pas supposés contenir de protéines susceptibles de coupler la protéine SMN à la protéine FMRP.

5/ Identification des domaines des protéines SMN et FMRP impliqués dans l'interaction

Afin d'identifier les domaines de chacune des protéines impliqués dans l'interaction observée, nous avons produit des protéines SMN et FMRP mutantes. Ainsi, nous avons montré qu'une région dans la partie C-terminale de la protéine FMRP est nécessaire à l'interaction avec la protéine SMN (aa 470-526) et que la délétion de la région codée par l'exon 7 de la protéine SMN diminue fortement l'association, alors que la délétion de sa boîte Y/G très conservée l'inhibe ***(Figures 5 et 6, article pages 185 et 186)***. Il est intéressant de noter que de nombreuses mutations de la boîte Y/G sont également retrouvées chez des patientS atteintS d'amyotrophie spinale. L'absence d'interaction avec la protéine FMRP suggère qu'un défaut dans l'association du complexe SMN avec la protéine FMRP pourrait contribuer à la pathologie.

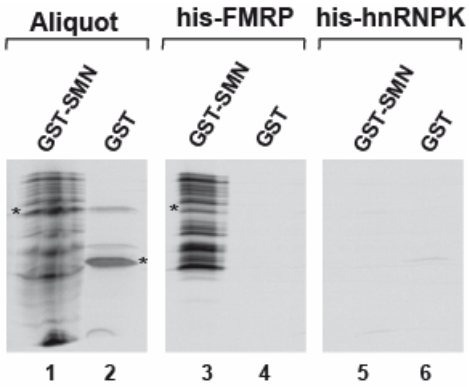


Figure 45 : Interaction *in vitro* de la protéine SMN produite chez *E. coli* et de la protéine FMRP immobilisée sur billes

Les protéines GST-SMN et GST ont été produites en présence de [^{35}S]-méthionine dans des extraits d'*E. coli* selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Ces protéines ont ensuite été incubées avec les protéines recombinantes his-FMRP (pistes 3 et 4) et his-hnRNP-K (pistes 5 et 6) produites, respectivement, dans le baculovirus (H. Moine, IGMC, Strasbourg, France) et chez *E. coli*. Ces protéines ont été purifiée et fixée sur billes Ni-NTA Agarose (Qiagen) d'après les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Après plusieurs lavages, les protéines retenues sur les billes ont été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12% et révélées par fluorographie. Aliquot correspond à 10% de la quantité de protéines radioactives utilisées pour chaque réaction (pistes 1 et 2).

Comme décrit en introduction, l'interaction des protéines Sm avec la protéine SMN est très fortement stabilisée par la présence de modifications post-traductionnelles dans les protéines Sm B/B', D1 et D3. En effet, certaines arginines de leurs domaines riches en répétitions RG portent des diméthylations symétriques (sDMA) spécifiquement reconnues par la protéine SMN (Brahms et al, 2000 ; Brahms et al, 2001 ; Friesen et al, 2001a). La présence de diméthylations symétriques est également importante pour l'interaction de la protéine SMN avec d'autres protéines telles que la coiline ou la protéine Lsm 4 (Hebert et al, 2002 ; Brahms et al, 2001) ***(Tableau IV, pages 36 et 37)***. Nous avons donc testé si l'interaction observée entre les protéines FMRP et SMN n'était pas médiée par la présence de méthylations sur certaines arginines des motifs RG de la protéine FMRP. Afin d'inhiber la formation de ces modifications post-traductionnelles, nous avons préalablement incubé les extraits de réticulocytes de lapin, dans lesquels était produite la protéine FMRP, avec un inhibiteur de méthylation : la S-Adénosyl-Homocystéine (S.A.H.) ***(Figure 46)***. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer qu'*in vitro,* la protéine FMRP méthylée et la protéine FMRP non méthylée s'associent aussi efficacement l'une que l'autre à la protéine SMN. Ainsi, la méthylation de la protéine FMRP n'interviendrait pas dans l'interaction avec la protéine SMN, contrairement à ce qui a été observé pour les protéines Sm (Brahms et al, 2000 ; Brahms et al, 2001 ; Friesen et al, 2001a).

L'ensemble de ces résultats a été publié dans un article paru dans *J. Biol. Chem.* dont je suis premier auteur.

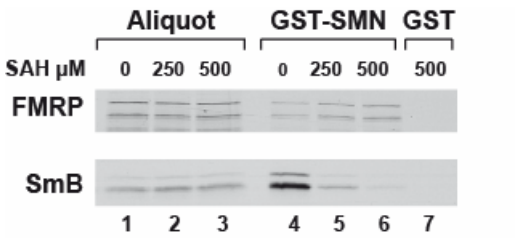


Figure 46 : La méthylation de la protéine FMRP n'est pas importante pour son interaction avec la protéine SMN

Les protéines FMRP et Sm B ont été produites en présence de [^{35}S]-méthionine dans des réticulocytes de lapin en présence ou non de concentrations croissantes d'inhibiteurs de méthylation SAH : S-adénosylhomocytéine (250 ou 500µM) selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Ces protéines ont ensuite été incubées avec les protéines recombinantes GST-SMN (pistes 4 à 6) et GST (piste 7) produites chez *E. coli*, purifiées et fixées à des billes de sépharose couplées au glutathion selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Après plusieurs lavages, les protéines immunosélectionnées ont été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12% et révélées par fluorographie. Aliquot correspond à 10% de la quantité de protéines radioactives utilisées pour chaque réaction (pistes 1 à 3).

"*In vitro* and *in cellulo* evidences for association of the Survival of Motor Neuron complex with the Fragile X Mental Retardation Protein".

N. Piazzon, F. Rage, F. Schlotter, H. Moine, C. Branlant et S. Massenet

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/cgi/content/full/M707304200/DC1

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 283, NO. 9, pp. 5598–5610, February 29, 2008
© 2008 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

In Vitro and *in Cellulo* Evidences for Association of the Survival of Motor Neuron Complex with the Fragile X Mental Retardation Protein*[S]

Received for publication, August 30, 2007, and in revised form, December 18, 2007 Published, JBC Papers in Press, December 19, 2007, DOI 10.1074/jbc.M707304200

Nathalie Piazzon[‡1], **Florence Rage**[§], **Florence Schlotter**[‡], **Hervé Moine**[¶], **Christiane Branlant**[‡], **and Séverine Massenet**[‡2]

From the [‡]*Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, the* [§]*Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR 5535, Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, and the* [¶]*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, CU de Strasbourg, France*

Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by reduced levels of the survival of motor neuron (SMN) protein. Although the SMN complex is essential for assembly of spliceosomal U small nuclear RNPs, it is still not understood why reduced levels of the SMN protein specifically cause motor neuron degeneration. SMN was recently proposed to have specific functions in mRNA transport and translation regulation in neuronal processes. The defective protein in Fragile X mental retardation syndrome (FMRP) also plays a role in transport of mRNPs and in their translation. Therefore, we examined possible relationships of SMN with FMRP. We observed granules containing both transiently expressed red fluorescent protein(RFP)-tagged SMN and green fluorescent protein(GFP)-tagged FMRP in cell bodies and processes of rat primary neurons of hypothalamus in culture. By immunoprecipitation experiments, we detected an association of FMRP with the SMN complex in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and in murine motor neuron MN-1 cells. Then, by *in vitro* experiments, we demonstrated that the SMN protein is essential for this association. We showed that the COOH-terminal region of FMRP, as well as the conserved YG box and the region encoded by exon 7 of SMN, are required for the interaction. Our findings suggest a link between the SMN complex and FMRP in neuronal cells.

The neuromuscular disease spinal muscular atrophy (SMA)[3] is characterized by degeneration of motor neurons of the spinal cord leading to muscular weakness and atrophy (reviewed in Refs. 1 and 2). The SMN (survival of motor neuron) protein is encoded by two genes, a centromeric *SMN1* gene and a telomeric *SMN2* gene. Over 98% of SMA patients have mutations in or deletions of the *SMN1* gene, and decreased levels of the SMN protein correlate with the phenotypic severity of SMA (3–5). The *SMN2* gene mostly produces a functionally defective form of the protein that lacks the domain encoded by exon 7 at the carboxyl terminus (6, 7). The SMN protein is ubiquitously expressed in all eukaryotes tested so far, except *Saccharomyces cerevisiae*. Its function is essential in all studied organisms (for review, see Ref. 8). SMN is associated with the proteins Gemin2 to Gemin8 in HeLa cells, to form a large stable complex called the SMN complex (9–19). This complex localizes to both the cytoplasm and the nucleus where it accumulates in nuclear bodies called Gems (20). Unrip is also a component of the SMN complex, except in Gems where this protein could not be detected (21, 22).

The SMN complex is thought to function in multiple cellular pathways related to RNA metabolism. More precisely, the SMN complex may play a central role in the assembly and metabolism of various RNPs in cells (reviewed in Refs. 23 and 24). The best characterized function of the SMN complex is the assembly of spliceosomal U snRNPs (for reviews, see Refs. 25 and 26). In the cytoplasm, each U snRNA except U6 associates with a set of Sm proteins (B/B′, D1, D2, D3, E, F, and G), which forms a seven-membered ring (Sm core) around the Sm site (27). The SMN complex interacts directly with both the Sm proteins and the U snRNAs and mediates the ATP-dependent assembly of the Sm core (14, 26, 28–35). The SMN complex likely plays additional roles in U snRNP biogenesis, *i.e.* cap hypermethylation of U snRNAs and nuclear import of U snRNPs (36–39). The SMN complex is also necessary for the formation of Sm and Lsm cores on small noncoding RNAs other than U snRNAs (33, 34, 40).

It is still unclear why motor neurons are specifically affected in SMA. Defect of a motor neuron-specific function of the SMN protein may be responsible for motor neuron degeneration in SMA (41, 42, and for reviews, see Refs. 2, 24, 43, and 44). In light

* This work was supported in part by the CNRS, the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche," and the "Association Française contre les Myopathies" (AFM). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Fig. S1.

[1] Pre-doctoral fellow from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche."

[2] To whom correspondence should be addressed: Laboratoire de Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: 33-3-83-68-43-07; Fax: 33-3-83-68-43-08; E-mail: severine.massenet@maem.uhp-nancy.fr.

[3] The abbreviations used are: SMN, survival of motor neuron; SMA, spinal muscular atrophy; FMRP, Fragile X mental retardation protein; G3BP, ras-GAP SH3 domain-binding protein; GST, glutathione *S*-transferase; snRNP, small nuclear ribonucleoprotein; hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; PBS, phosphate-buffered saline; IP, immunoprecipitation; RFP, red fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein.

of this hypothesis, the SMN protein was found to be present in dendrites, axons, and growth cones, suggesting a function of the SMN protein in specific neuronal mechanisms, distinct from U snRNP assembly (45–53). More precisely, the SMN protein localizes in granules that are actively transported into neuronal processes and growth cones, and which show frequent colocalization with ribosomal RNAs (51). Only a subset of these SMN granules also contains the Gemin proteins, indicating the presence of diverse SMN-containing multiprotein complexes in axons and dendrites (47, 52, 53). Local protein synthesis in axons and dendrites is crucial for axonal growth, pathfinding, and regeneration, as well as synapse formation and plasticity (reviewed in Refs. 54–58). It was shown that SMN-deficient motor neurons have reduced axon outgrowth and pathfinding, as well as synapse dysfunction (2, 41, 50, 59). Moreover, the SMN protein was shown to interact with the RNA-binding protein hnRNP R (49, 60), and this interaction may be necessary for hnRNP R association with the 3′ untranslated region of β-actin mRNA and for efficient transport of this mRNA to growth cones (49, 50). Taken together, these observations point out a possible function of the SMN protein, and perhaps of the SMN complex, in the assembly, translation regulation, and/or transport of localized mRNP complexes (reviewed in Refs. 2, 43, and 44).

One way to get additional insights into SMN function in transport and translation of mRNAs in dendrites and axons is to identify SMN protein partners that are known to be involved in these neuronal mechanisms. The Fragile X mental retardation protein (FMRP), which is defective in the Fragile X mental retardation syndrome, has been shown to be a regulator of translation (Refs. 61–64, for a review, see Ref. 65). This RNA-binding protein shuttles between the nucleus and cytoplasm, suggesting that it may also be involved in RNA trafficking (66–68). Despite this shuttling property, FMRP is predominantly localized in the cytoplasm, and is associated in an RNA-dependent manner with polyribosomes. In neurons, FMRP has been proposed to play a role in dendritic transport of some specific mRNAs and to regulate local protein synthesis in synapses in response to synaptic stimulation signals (for reviews, see Refs. 65 and 69). In particular, exaggerated activation of protein synthesis by metabotropic glutamate receptors could be responsible for long term depression defects observed in the hippocampal neurons lacking FMRP (reviewed in Ref. 70). FMRP is also localized to growth cones of developing axons, and is proposed to be important for growth cone morphology and motility and for synapse formation (71, 72).

In the present study, we provide experimental evidences for a physical association of the SMN complex with FMRP in neuronal cell extracts. The SMN and FMRP protein domains required for this association are identified by site-directed mutagenesis and *in vitro* assays. The biological significance of these data is supported by analysis of the respective localizations of the SMN and FMRP proteins in rat primary neurons of hypothalamus in culture.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA Constructs and Antibodies—Plasmids expressing FLAG-tagged FMRP (pTL1 iso7 Flag-FMRP), His-tagged FMRP, His-tagged FMRP I304N, and glutathione *S*-transferase (GST)-tagged FMRP were described previously (73, 74). Deletion into the pTL1 iso7 Flag-FMRP vector was generated by PCR using appropriate oligonucleotides to produce pTL1 iso7 Flag-FMRPΔ470–485 vector, expressing FLAG-tagged FMRPΔ470–485 (deleted of amino acids 470 to 485), and iso7 Flag-FMRPΔ1–134 vector, expressing FLAG-tagged FMRPΔ1–134 (FMRPΔNDF) (deleted of the amino-terminal 134 amino acids). DNA fragments coding for FMRPΔ527–632 (FMRPΔRGG) (deleted of the carboxyl-terminal 106 amino acids) and FMRPΔ470–632 (deleted of the carboxyl-terminal 162 amino acids) were subcloned downstream of the cytomegalovirus promoter into a modified pcDNA3 vector (Invitrogen) containing an in-frame FLAG tag sequence at the amino terminus (FLAG-pcDNA3) (75). The GFP-FMRP and SMN-RFP constructs were generated with Gateway technology (Invitrogen).

The plasmids expressing FLAG-tagged SMN WT (pcDNA3-Flag-SMN), GST-tagged SMN WT, SMNΔYG (deleted of the carboxyl-terminal 26 amino acids), SMNΔEx7 (deleted of amino acids encoded by exon 7), SMNΔTudor (deleted of amino acids encoded by exon 3), and SMNΔEx2B (deleted of amino acids encoded by exon 2B) were kind gifts from Gideon Dreyfuss (9, 20, 76, 77). These constructs produce two bands, likely because translation starts at both the ATG tag and the native SMN ATG. The DNA fragment coding for SMNΔN27 (deleted of the amino-terminal 27 amino acids) was generated by PCR amplification using specific primers from the pcDNA3-Flag-SMN plasmid. The insert was cloned downstream of the cytomegalovirus promoter into the FLAG-pcDNA3 vector (75).

The constructs for production of FLAG-tagged Gemin2, myc-tagged Gemin3, myc-tagged Gemin4, FLAG-tagged Gemin5, untagged Gemin8, His-tagged Unrip, and FLAG-tagged SmB were described previously and are kind gifts from G. Dreyfuss and L. Pellizzoni (10, 12, 15, 18, 21, 29, 78). Plasmid expressing FLAG-tagged Snurportin1 was described previously (Flag-pcDNA3-Snurportin1) (36). For production of GST-tagged Snurportin1 in bacteria, a DNA fragment corresponding to the open reading frame of Snurportin1 was generated by PCR amplification using specific primers, and cloned into the pGEX-6P-2 plasmid (Amersham Biosciences). DNA fragments corresponding to the open reading frame of Gemin6 and Gemin7 were generated by PCR amplification using specific primers and genomic cDNA, and cloned downstream of the cytomegalovirus promoter into the FLAG-pcDNA3 vector. For the generation of the stable cell line that expresses FLAG-tagged Gemin2, a DNA fragment coding for FLAG-tagged Gemin2 was generated by PCR amplification using specific primers from pcDNA3-Flag-Gemin2 plasmid and cloned into the pTRE2 plasmid downstream of a promoter containing the tetracycline-responsive element (BD Biosciences). All the constructs were analyzed by automated sequencing.

The antibodies used in these experiments were as follows: anti-SMN (2B1) (20), anti-Gemin2 (2E17) (9), anti-Gemin3 (12H12) (10), anti-Gemin4 (17D10) (12), anti-Gemin5 (10G11) (15), anti-Gemin6 (20H8) (79), anti-Gemin8 (1F8) (18), anti-Unrip (3G6) (18), anti-hnRNP A1 (4B10) (80), anti-hnRNP

C1/C2 (4F4) (81), and anti-FMRP (1C3) used for Western blotting (82) and (7G1) used for immunoprecipitation (83), anti-Sm proteins (Y12) (84), anti-FLAG (Sigma), anti-β tubulin (SAP.4G5) (Sigma), and anti-G3BP monoclonal antibody (1F1) (Rhône-Poulenc Rorer).

Cell Culture and Transfection—SH-SY5Y and MN1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 units/ml penicillin/streptomycin, and 2.9 mg/ml glutamine (Invitrogen). Cells growing on 100-mm culture dishes (about 60% confluent) were transfected with 8 μg of DNA using the JetPEI Transfection Kit (PolyPlus Transfection) according to the manufacturer's recommendation. Following overnight incubation with DNA, cells were washed and fresh medium added. Transfected cells were processed for immunoprecipitation 48 h after transfection. The transfection efficiency of SH-SY5Y cells was in average equal to 10% as indicated by the ratio of GFP-FMRP positive cells to total cells.

For protein localization experiments, primary cultures were prepared by mechanoenzymatic dissociation of fetal (day 7) Sprague-Dawley rat hypothalami, as previously described (85). Then, primary neurons were transfected using the calcium phosphate method according to Xia *et al.* (86). Briefly, cells were placed in a transfection medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium, DMKY (1×) (0.5% phenol red, 1 M Hepes, 1 M $MgCl_2$), and received precipitate that was formed for 30 min, then cells were incubated for 45 min with 2 μg of each plasmid. After transfection, the medium was removed and replaced by 1× HBes (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.4 mM Na_2HPO_4, 15 mM D-glucose, 42 mM Hepes, pH 7) for 1 min. Cells were put back in their filtered medium for 24 h. These cells were transfected with plasmids expressing GFP-FMRP or RFP-SMN. The percentage of transfected cells was determined directly using a microscope and is on average equal to 5%. To induce stress granule formation, the cells were treated with 0.5 mM arsenite for 1 h.

Generation of a Stable Cell Line That Expresses FLAG-tagged Gemin2—The generation of a stable cell line that expresses FLAG-tagged Gemin2 was done according to the manufacturer's recommendation (BD Biosciences) and according to Ref. 16, except that the Tet-Off system was used instead of the Tet-On system. Briefly, HeLa Tet-Off cells that constitutively express the tetracycline transactivator were cotransfected with the pTRE2 plasmid encoding FLAG-Gemin2 under the control of a promoter containing the tetracycline-responsive element, and the pTK-Hyg plasmid (BD Biosciences) carrying the hygromycin resistance gene. Stable clones were obtained by double selection in the presence of G418 (100 μg/ml) and hygromycin (200 μg/ml). Individual clones were isolated and analyzed by Western blotting for the expression of FLAG-Gemin2. To avoid possible side effects of Gemin2 overexpression, a stable cell line that expresses low levels of FLAG-Gemin2 was selected for SMN complex purification.

Affinity Purification of SMN Complex—Native SMN complexes were affinity purified as described by (16). In summary, total cell extracts from parental HeLa Tet-Off cells and from the HeLa Tet-Off stable cell line expressing FLAG-Gemin2 were prepared by resuspending cell pellets from five 100-mm culture dishes in RSB 100 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl) containing 0.1% Igepal and protease inhibitors (Roche). Cells were sonicated briefly. Following centrifugation at 10,000 × *g* for 15 min, supernatants were passed through a 0.2-μm filter and added to anti-FLAG M2 beads (Sigma) for 2 h at 4 °C. Supernatants were discarded, and beads were extensively washed with RSB 100 containing 0.02% Igepal. Then, three high salt washes were performed with 10 bead volumes of RSB 500 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl) containing 0.02% Igepal for 15 min at 4 °C. Following three washes with RSB 100 containing 0.02% Igepal, native SMN complexes were eluted from the beads by competitive displacement of FLAG-Gemin2 with 0.5 mg/ml of 3X-FLAG peptide (Sigma) in RSB 100 buffer containing 0.02% Igepal for 1 h at 4 °C. The composition of native SMN complexes were analyzed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels and silver staining or Western blotting.

Recombinant Protein Production and in Vitro Binding Experiments—Recombinant GST-FMRP, His-FMRP, and His-FMRP I304N were produced in a baculovirus system. The other GST-tagged recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS cells (Promega) and purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). *In vitro* translated proteins were produced in the presence of [^{35}S]methionine (GE Healthcare) using a rabbit reticulocyte lysate and a coupled transcription-translation system (Promega). Arginine methylation of the proteins was inhibited by preincubating the lysate with different amounts of *S*-adenosylhomocysteine (250 and 500 μM) (Sigma) at room temperature for 10 min prior to the addition of the DNA template. For *in vitro* binding experiments, 4 μg of GST or GST-tagged proteins bound to glutathione-Sepharose beads were incubated with *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled proteins in RSB 200 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl) containing 0.05% Igepal for 2 h at 4 °C, or with native purified SMN complex in RSB 100 buffer containing 0.02% Igepal for 2 h at 4 °C. RNase A (0.2 mg/ml) was added to the translation product and the mixture was incubated for 15 min at 30 °C prior to the binding experiment. Following five washes with the same buffer, bound proteins were eluted by boiling in SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 3.7 M β-mercaptoethanol), and analyzed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels followed by autoradiography or Western blotting.

Immunoprecipitation Experiments—For total cell extract preparation, SH-SY5Y cells were resuspended in RSB 100 buffer containing 0.01% Igepal and protease inhibitors (Roche), briefly sonicated three times on ice, and centrifuged 15 min at 10,000 × *g* at 4 °C. Total cell extracts were incubated with anti-FLAG beads (Sigma) for 2 h at 4 °C in RSB 100 buffer containing 0.01% Igepal. The beads were extensively washed with RSB 200 buffer containing 0.05% Igepal, and the immunoprecipitated proteins were eluted by boiling in SDS-PAGE sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. For immunoprecipitation using anti-FMRP 7G1 antibody, MN-1 cells were resuspended in RSB 250 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl) containing 0.01% Igepal and protease inhibitors. Total extracts were prepared as indicated above

and incubated with anti-FMRP 7G1 and anti-β-tubulin antibodies immobilized on G-Sepharose beads for 2 h at 4 °C in RSB 250 buffer containing 0.01% Igepal. The beads were extensively washed with RSB 250 buffer containing 0.05% Igepal, and the immunoprecipitated proteins were analyzed as described above.

Immunofluorescence Microscopy—After 24 h transfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 20 min. After three washes with PBS, cells were permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 20 min, then rinsed three times with 1× PBS. Blocking was performed for 1 h in PBS containing 1% bovine serum albumin and 5% goat normal serum. Cells were incubated overnight at 4 °C in a humid chamber with primary antibody in blocking buffer. After rinsing in PBS, they were incubated for 2 h at room temperature in a humid chamber with anti-goat IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The secondary antibodies were diluted in the same buffer as the primary antibodies. After three washes with 1× PBS, sections were mounted in Vectashield containing 4′,6-diamidino-2-phenylindole.

Image Acquisition and Processing—Images were acquired on a DMRA microscope equipped for epifluorescence, and with a 100 PlanApo objective and a 1.6 eyepiece. Digital images were recorded with a 12-bit C4795-NR CCD camera (Hamamatsu). Both the camera and the microscope were controlled by the software Metamorph (Universal Imaging). When necessary, maximal likelihood estimation deconvolution was performed with the software Huygens (Bitplane, Zurich, Switzerland), on stacks of 11 images taken with a Z-step of 0.5 μm. Maximal image projections of the resulting stacks were then converted to 8-bit images and colorized with Photoshop. For colocalization analysis, we counted all the spots and reported the percentage of SMN in FMRP foci. This analysis was done on a total of 4 cells with an average of 60 spots.

RESULTS

The SMN Complex Is Associated with FMRP in Human Neuroblastoma SH-SY5Y and Murine Motor Neuron MN1 Cells in Culture—To test whether the SMN complex can associate with FMRP in cells, total extracts were prepared from human neuroblastoma SH-SY5Y cells transiently expressing FLAG-tagged FMRP (FLAG-FMRP), or FLAG-tag alone (mock) as a negative control. The extracts were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies. Immunoprecipitated proteins (IP) and aliquots of the respective extracts (Total) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using specific antibodies. All the tested components of the SMN complex, namely SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin5, Gemin6, Gemin8, and Unrip were coimmunoprecipitated with FLAG-FMRP (Fig. 1*A*, *lane 3*). In contrast, the abundant RNA-binding proteins hnRNP C1/C2 were not coimmunoprecipitated, which indicated that the immunoprecipitation was specific (Fig. 1*A*, *lane 3*). Because we did not have an antibody against Gemin7, this protein was not probed in our assays. However, because Gemin6 and Gemin7 form an heterodimer and Gemin7 mediates the interaction of Gemin6 and Unrip with the SMN complex (17, 19, 87), Gemin7 was likely present in the immunoprecipitate. None of the SMN complex components were detected

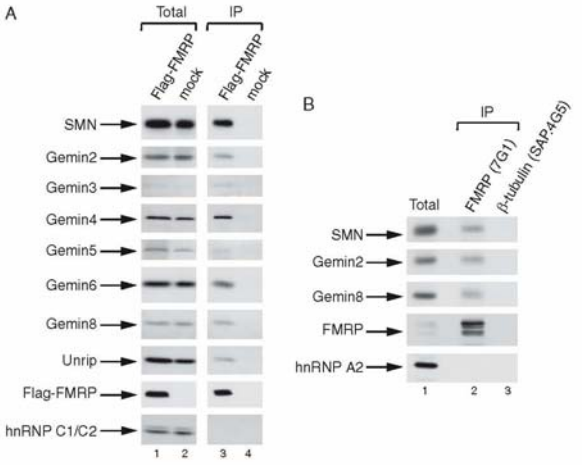


FIGURE 1. **The SMN complex is associated with FMRP in human and murine neuronal cell lines in culture.** *A*, immunoprecipitation experiments using anti-FLAG antibody (*IP*, *lanes 3* and *4*) were carried out on total extracts prepared from human neuroblastoma SH-SY5Y cells that were transiently transfected with a DNA construct expressing FLAG-tagged FMRP (*Flag-FMRP*, *lanes 1* and *3*) or the empty vector (*mock*, *lanes 2* and *4*). The immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against the indicated proteins. 2.5% of the extracts used in each experiment are shown (*Total*, *lanes 1* and *2*). *B*, immunoprecipitation experiments using anti-FMRP 7G1 antibody (*IP*, *lane 2*) and anti-β tubulin SAP.4G5 antibody (*IP*, *lane 3*) were carried out on total extracts prepared from murine motor neuron MN-1 cells. The 7G1 antibody recognizes the various FMRP isoforms. The immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against the indicated proteins. 2.5% of the extract used in the experiments is shown (*Total*, *lane 1*).

in the control immunoprecipitate from mock-transfected extracts (Fig. 1*A*, *lane 4*). Our experiment showed that transiently expressed FLAG-FMRP associates with the entire SMN complex. Because it is difficult to define the stoichiometry of each component of the SMN complex in the immunoprecipitate by Western blotting, it is also possible that FLAG-FMRP associates with some of the SMN complex components taken individually.

To verify whether endogeneous FMRP also associates with the SMN complex, total extracts from murine motor neuron MN-1 cells (88) were immunoprecipitated with the anti-murine FMRP 7G1 antibody, which was shown to efficiently immunoprecipitate the various endogeneous FMRP isoforms (83). Anti-β tubulin antibody was used as a negative control. Immunoprecipitated proteins (IP) and aliquot of the respective extracts (Total) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using specific antibodies (Fig. 1*B*). Only a few of the available antibodies against the human SMN complex components cross-react with the murine proteins. However, the experiment showed that the analyzed components of the SMN complex, *i.e.* SMN, Gemin2, and Gemin8, were coimmunoprecipitated with endogeneous FMRP (Fig. 1*B*, *lane 2*). In contrast, the hnRNP A2 protein was not coimmunoprecipitated. Neither SMN, nor Gemin2 or Gemin8 were detected in the control immunoprecipitate using anti-β-tubulin antibody (Fig. 1*B*, *lane 3*).

SMN and FMRP Proteins Partially Colocalize in Cell Bodies and Processes of Rat Primary Neurons in Culture—Previous studies on cultured neurons have demonstrated the presence of

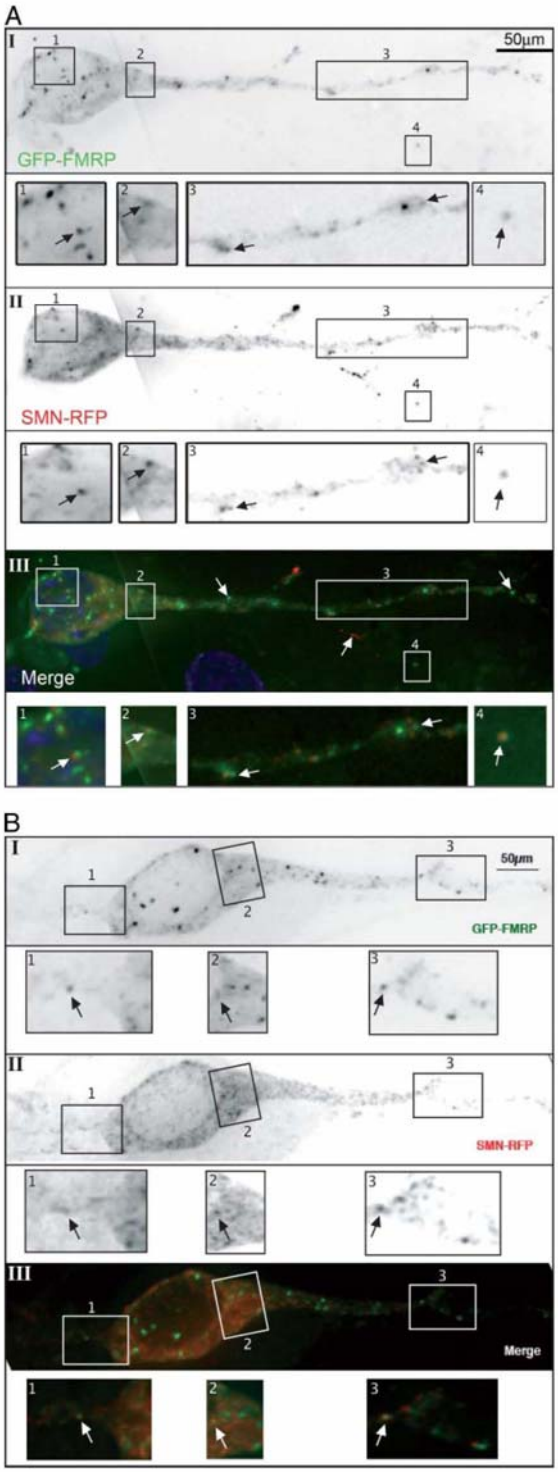


FIGURE 2. **A fraction of neuronal SMN granules contains FMRP protein.** *A* and *B*, rat primary neurons of hypothalamus were co-transfected with plasmids expressing GFP-FMRP and SMN-RFP fusion proteins. Localization of GFP-FMRP is shown in *I* and localization of SMN-RFP is shown in *II*. The combined images are shown in *III*. *Blue* signals demarcate nuclei visualized by 4′,6-diamidino-2-phenylindole staining in *A*. Eleven images were taken with a *Z*-step of 0.5 μm and colocalization analysis was done on these separate images. The figures represented here are a stack of the 11 images. Magnified views show examples of granules containing both SMN and FMRP (in *A*, *arrows in the enlarged insets 2–4*, as examples, in *B*, *arrows in the enlarged insets 1–3*, as examples), SMN-containing granules juxtaposed to FMRP-containing granules (in *A*, see *arrow in the enlarged insets 1*, as example), and SMN-containing granules independent from FMRP-containing granules (in *A*, see *arrows in the upper figure* of *Panel III*, as examples). *Scale bar*, 50 μm.

SMN-containing granules in processes and growth cones (47, 51–53). FMRP was also observed within trafficking granules in neuronal processes (89, 90). To gain further insights into the relationship between the SMN complex and FMRP in cells, we looked for possible colocalization of SMN and FMRP in rat primary neurons of hypothalamus in culture. To this end, primary neurons were transiently transfected to express GFP-tagged FMRP and RFP-tagged SMN (Fig. 2, *A* and *B*). We observed some granules containing either FMRP or SMN that were independent one from the other (for examples, Fig. 2*A*, *arrows* in the *upper part* of *panel III*). In addition, in both cell bodies and processes, some of the SMN-containing granules also contained FMRP (26.6 ± 6% and 45.7 ± 2%, respectively) (Fig. 2*A*, *arrows* in the enlarged *insets 2–4*, as examples, Fig. 2*B*, *arrows* in the *enlarged insets 1–3*, as examples). The indicated percentages of colocalization were average values of percentages established by analysis of four transfected primary neurons, as described in Costes *et al.* (91). Moreover, some SMN-containing granules were juxtaposed to FMRP-containing granules (Fig. 2*A*, *arrow*, in the *enlarged insets 1*, as example). Thus, our data indicated the presence of granules containing either one of the two FMRP and SMN proteins, or both of them.

Massive overexpression of SMN or FMRP was previously found to induce the accumulation of stress granules (63, 92). Therefore, we had to verify that the low expression of SMN-RFP and GFP-FMRP in our experiments did not induce stress granule formation (supplementary data Fig. 1). The ras-GAP SH3 domain-binding protein (G3BP), which is diffusely distributed throughout the cytoplasm (93, 94), is known to be recruited to cytoplasmic stress granules under stress conditions (95). We used this protein as a marker of stress granules. Rat primary neurons were exposed 1 h to arsenite treatment (concentration of 0.5 mM). As revealed by immunolocalization of G3BP, the arsenite treatment induced the formation of stress granules in cell bodies of cells transiently expressing or not SMN-RFP. Interestingly, no stress granules were detected in neurites after arsenite treatment. Moreover, in contrast to what was previously observed in HeLa cells and in neuronal SKN-MC cultured cells (92), SMN-RFP was still evenly distributed throughout the cell body of rat primary neurons after arsenite treatment, and did not accumulate in stress granules in our experimental conditions. The diffuse distribution of G3BP observed throughout the cytoplasm in cells that were transiently expressing SMN-RFP and were not treated by arsenite demonstrated the absence of stress granule formation in these conditions (supplementary data Fig. 1). A similar observation was made after transient expression of GFP-FMRP (data not shown). Therefore, we excluded the possibility that the SMN-

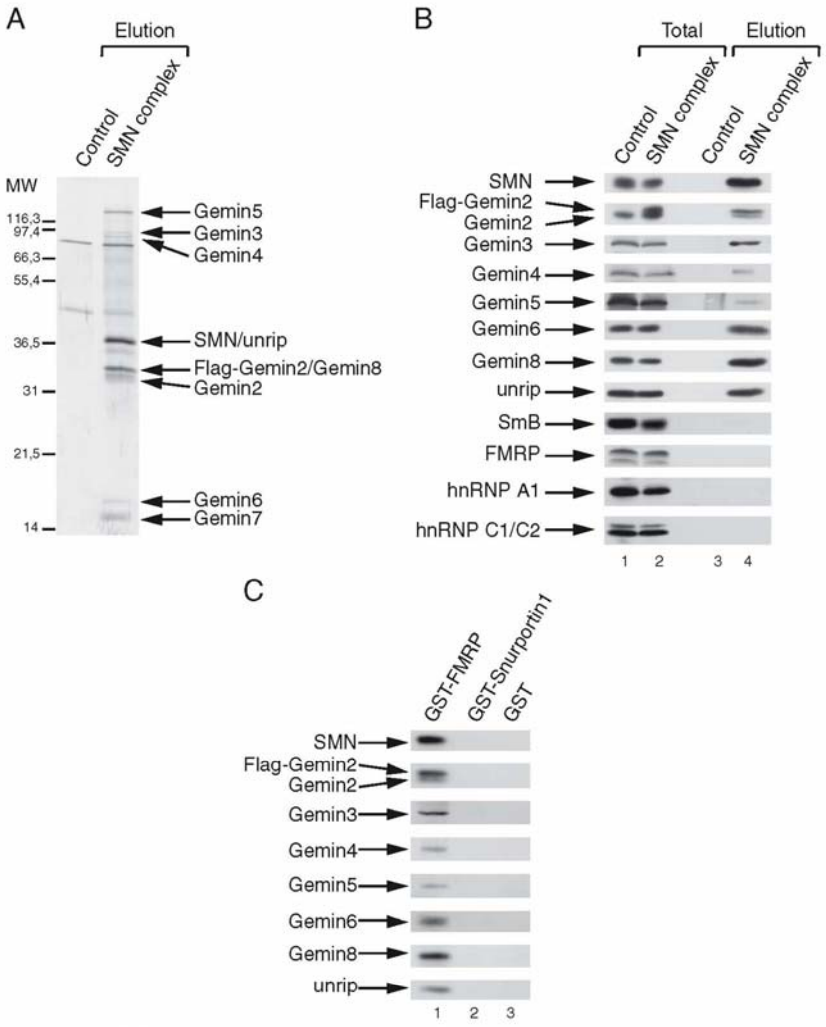


FIGURE 3. **Purified native SMN complex associates with FMRP *in vitro*.** *A*, native SMN complexes (SMN complex) were purified from total extracts prepared from HeLa Tet-Off cells that stably expressed FLAG-tagged Gemin2 by immunoprecipitation with anti-FLAG antibodies. After elution with an excess of FLAG peptides, the protein composition of the complexes was analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining (*Elution*). The nonspecific proteins purified from HeLa Tet-off cells that do not express FLAG-Gemin2 are shown as a control (*Control*). The protein pattern was compared with those previously observed in Refs. 16, 18, and 21 and the proteins were assigned to known proteins of the SMN complex according to their molecular weights (*MW*). The identity of the proteins was confirmed by Western blotting analysis (see *B*). *B*, the purified native SMN complex (SMN complex) shown in *A* was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies directed against the indicated proteins (*Elution, lane 4*). A control experiment was performed with HeLa Tet-Off cells that do not express FLAG-Gemin2 (*Elution, lane 3*). *Lanes 1* and *2* correspond to 8% of the cellular extracts used in each assay. *C*, purified native SMN complexes shown in *A* and *B* were incubated with recombinant GST-FMRP immobilized on beads (*lane 1*), GST-Snurportin1 (*lane 2*), or GST alone (*lane 3*). The bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies directed against the indicated proteins. *Lane 4* of *B* was loaded with 25% of the amount of SMN complex used in each binding reaction.

RFP and GFP-FMRP containing granules detected in the transfected cells were stress granules.

FMRP Associates in Vitro with Purified SMN Complexes—We next examined whether FMRP can associate *in vitro* with purified SMN complexes, which were prepared using a stably transfected cell line expressing a FLAG-Gemin2 construct (Fig. 3). The stringent purification conditions used in our assays (500 mM NaCl) were previously shown to produce complexes containing all the known components of the SMN complex, but no detectable amount of Sm proteins or other proteins known to interact with the SMN complex, as well as no detectable amount of RNAs (16, 18) (see "Experimental Procedures"). We incubated cell extracts from the FLAG-Gemin2 stable cell line (SMN complex) and the parental HeLa cell line used as a control (Control) with anti-FLAG antibodies. The proteins bound on the beads were eluted by competition with an excess of FLAG peptide (Elution) and analyzed by SDS-PAGE and silver staining (Fig. 3*A*) or Western blotting using appropriate antibodies (Fig. 3*B*, *lanes 3* and *4*). As previously observed (16, 18), the purified complexes contained all the components of the SMN complex (Fig. 3, *A* and *B*), but no detectable amounts of SmB (Fig. 3*B*, *lane 4*). The absence of the abundant RNA-binding proteins hnRNP A1 and hnRNP C1/C2 in the immunoprecipitate confirmed the specificity of the purification (Fig. 3*B*, *lane 4*). Importantly, FMRP was not detected in these complexes by Western blotting (Fig. 3*B*, *lane 4*). Then, the purified SMN complexes were incubated with a recombinant GST-FMRP protein fusion, immobilized on glutathione-Sepharose beads (Fig. 3*C*). GST-Snurportin1 or GST alone were used as negative controls. The bound proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using specific antibodies. As shown in Fig. 3*C*, purified SMN complexes were retained on GST-FMRP (*lane 1*), but not on GST-Snurportin1 or GST alone (*lanes 2* and *3*). We concluded that FMRP can associate *in vitro* with the SMN complex.

Among the Components of the SMN Complex, Only SMN Associates in Vitro with FMRP—Next, we determined which component(s) of the SMN complex can associate with FMRP *in vitro*. For this assay, a GST-FMRP fusion protein, or the GST protein alone as a negative control, was immobilized on glutathione-Sepharose beads. The beads were then incubated with one of the following [^{35}S]methionine-labeled proteins: SMN, Gemin2 to Gemin8, or Unrip, which

The Journal of Biological Chemistry

Association of FMRP with SMN

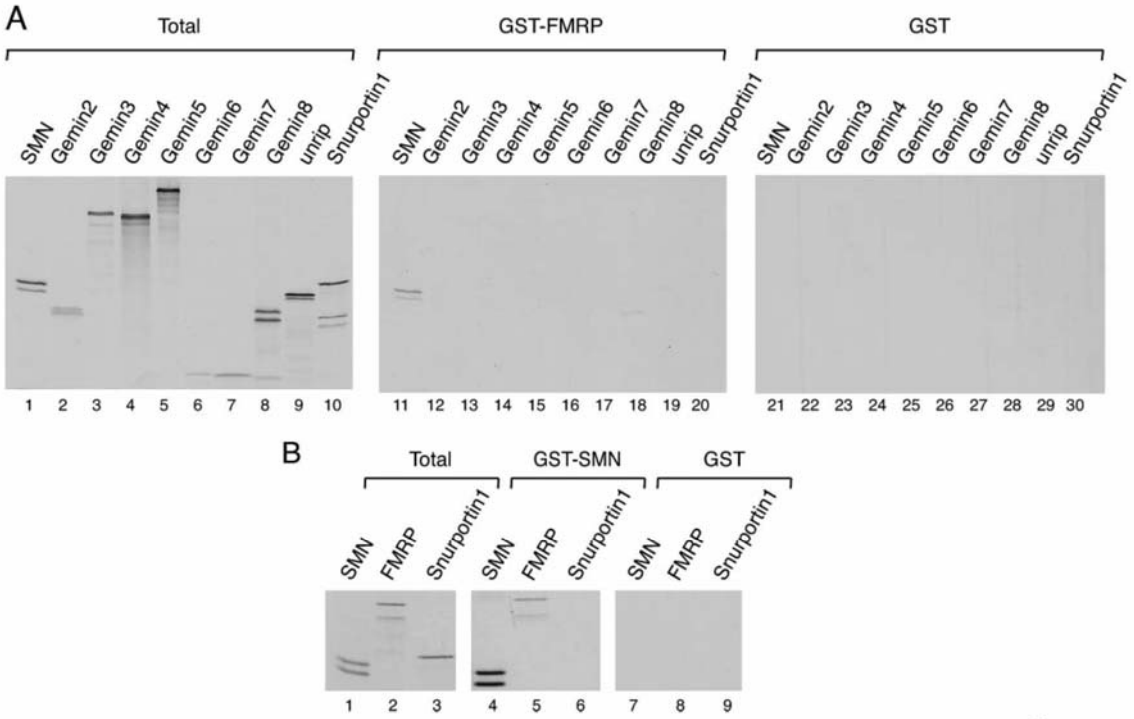


FIGURE 4. **The SMN protein, but none of the other components of the SMN complex, interacts with FMRP *in vitro*.** *A*, *in vitro*-translated [^{35}S]methionine-labeled SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin5, Gemin6, Gemin7, Gemin8, Unrip, as well as Snurportin1, which was used as a negative control, were incubated with recombinant GST-FMRP immobilized on beads (*lanes 11–20*). Recombinant GST immobilized on beads was used as a negative control (*lanes 21–30*). After extensive washes, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The *Total* lanes show 10% of each labeled protein used in binding reactions (*lanes 1–10*). *B*, *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled FMRP, as well as SMN and Snurportin1, which were used, respectively, as positive and negative controls, were incubated with recombinant GST-SMN immobilized on beads (*lanes 4–6*). Recombinant GST immobilized on beads was used as a negative control (*lanes 7–9*). Following extensive washes, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The *Total* lanes show 10% of each labeled protein used in binding reactions (*lanes 1–3*).

were produced by *in vitro* transcription-translation using a rabbit reticulocyte lysate (Fig. 4). To exclude RNA-mediated interactions, the *in vitro* translated products were treated with RNase A. As a control, a similar experiment was performed with Snurportin1, which is known to associate *in cellulo* with the SMN complex through an interaction with spliceosomal U snRNAs (36). As shown in Fig. 4*A*, in contrast to the other components of the SMN complex or Snurportin1 (*lanes 12–20*), SMN bound to GST-FMRP (*lane 11*). However, one cannot exclude the existence of a faint association of FMRP with components of the SMN complex other than SMN, which could not be detected in our experimental conditions. None of the tested proteins showed binding to GST (*lanes 21–30*), except Gemin8, which bound slightly and unspecifically to both GST-FMRP and GST (*lanes 18* and *28*). The association between SMN and FMRP was also observed when a [^{35}S]methionine-labeled SMN protein was produced by *in vitro* transcription-translation in *E. coli* extract (data not shown). In a reverse experiment, a recombinant GST-SMN protein was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with [^{35}S]methionine-labeled SMN, FMRP, or Snurportin1 produced by *in vitro* transcription-translation in a rabbit reticulocyte lysate. The labeled SMN protein was used as a positive control because SMN self-associates (96, 97). As shown in Fig. 4*B*, in contrast to Snurportin1, both FMRP and SMN associated with GST-SMN. None of these proteins showed binding to GST alone. These experiments indicated that FMRP associates *in vitro* with SMN and that this association is not mediated by RNAs.

A COOH-terminal Region of FMRP Is Necessary for Interaction with SMN—SMN interacts directly with the arginine- and glycine-rich domains of several proteins including the Sm proteins, fibrillarin, GAR1, coilin, and hnRNP Q/R (reviewed in Ref. 32). The COOH-terminal domain of FMRP also contains an arginine- and glycine-rich domain called the RGG box (98, 99) and several RG and GR repeats are present downstream from the RGG box (RG/GR repeats, amino acids 470 to 485) (Fig. 5*A*). Moreover, several domains of FMRP are already known to mediate interactions with protein partners, *i.e.* the region encoded by exon 7 is necessary for FXR1P, FXR2P, CYFIP1, and CYFIP2 binding, as well as for FMRP dimerization (100, 101), the region encoded by exons 4 and 5 within the NDF region (NH_2-terminal domain of FMRP) (amino acids 66–134) is necessary for NUFIP and 82-FIP binding (102, 103), the region spanning amino acids 490–526 is necessary for MSP-58 binding (104), and the FMRP COOH-terminal region (amino acids 419 to 632) is sufficient for Ran-BPM binding (105).

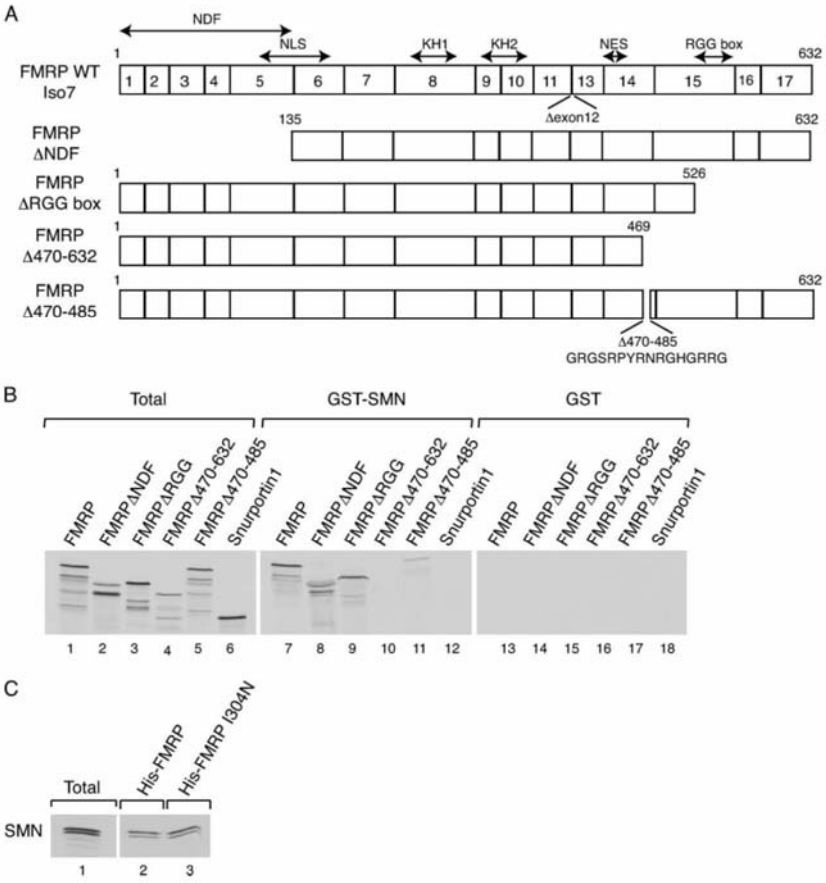


FIGURE 5. **A small COOH-terminal region of FMRP is necessary for interaction with SMN.** *A*, schematic representation of FMRP wild-type and deletion mutants used in binding assays. Regions denoted *1–17* correspond to the regions encoded by exons 1–17. Wild-type FMRP Iso7 has been used. It lacks the region encoded by exon 12 and is the most frequent FMRP isoform (150). *NDF* (NH_2-terminal domain of FMRP), *NLS* (nuclear localization signal), *NES* (nuclear export signal), *KH1*, *KH2*, and the *RGG* box are indicated. The sequence spanning amino acids 470–485 is shown. *B*, *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled wild-type FMRP or the indicated deletion mutants were incubated either with recombinant GST-SMN immobilized on beads (*lanes 7–12*), or with GST alone used as a negative control (*lanes 13–18*). Following extensive washes, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The *Total* lanes show 10% of the labeled proteins used in each binding reaction (*lanes 1–6*). *C*, *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled wild-type SMN was incubated with either recombinant His-FMRP (*lane 2*) or His-FMRP I304N mutant (*lane 3*) immobilized on beads. Following extensive washes, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The *Total* lanes show 10% of labeled SMN protein used in each binding reaction (*lane 1*).

To determine which of the FMRP domain(s) is/are important for binding to SMN, a series of truncated versions of the FMRP protein were produced by *in vitro* translation in the presence of [^{35}S]methionine (Fig. 5*A*). The wild type and mutated FMRP were incubated with an immobilized GST-SMN fusion protein. The GST protein alone was used as a negative control. As shown in Fig. 5*B*, deletion of the COOH-terminal 106 amino acids of FMRP (amino acids 527–632) (FMRPΔRGG, *lane 9*), including the RGG box, as well as deletion of the NH_2-terminal domain (FMRPΔNDF, amino acids 1–134, *lane 8*) did not impair the association with SMN. In contrast, deletion of amino acids 470–632 (FMRPΔ470–632, *lane 10*) abolished the interaction and deletion of the RG/GR repeats (FMRPΔ470–485, *lane 11*) reduced it significantly. These results indicated that the FMRP region spanning amino acids 470–526 is necessary for binding to SMN and that the RG/GR repeat domain of FMRP (amino acids 470–485) is important but not essential for the association.

The point mutation I304N within the FMRP KH2 domain is known to lead to a severe mental retardation phenotype (106). FMRP protein carrying this mutation does not interact with RNAs harboring a "kissing complex" and does not associate with polyribosomes (107, 108). Therefore, we compared the capability of immobilized recombinant FMRP and FMRP I304N proteins to associate with *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled SMN protein. We observed that the I304N mutation did not impair association with SMN *in vitro* (Fig. 5*C*, compare *lane 3* with *lane 2*).

The symmetric dimethylarginines present within the RG-rich domain of several SMN-interacting proteins, *i.e.* SmB, SmD1, SmD3, Lsm4, and coilin, strongly enhance their binding to SMN (109–112). As FMRP contains monomethylated and asymmetrically dimethylated arginines in its RGG box and perhaps in other regions (113, 114), we compared the binding of SMN to methylated and unmethylated forms of FMRP and showed that FMRP methylation is not essential for efficient association of FMRP with SMN (data not shown).

Association of SMN with FMRP Requires the Conserved SMN YG Box and Is Defective for SMNΔEx7—Three regions of SMN are particularly conserved throughout evolution, *i.e.* the region encoded by exon 2A, the Tudor domain, and the YG box (Fig. 6*A*). These three regions have been implicated in SMN oligomerization and SMN binding to several proteins (reviewed in Refs. 8 and 32). Most of the mutations found in the *SMN1* gene of SMA patients are clustered in these three domains (115). To define the SMN domain(s) that is required for binding to FMRP, we tested the association of *in vitro* translated SMN deletion mutants with an immobilized GST-FMRP fusion protein or with GST alone. As shown in Fig. 6, SMNΔN27, lacking the NH_2-terminal 27 amino acids, bound to FMRP as efficiently as wild-type SMN (*lane 9*). The same result was obtained for SMNΔEx2B deleted of the amino acids encoded by exon 2B (Fig. 6, *lane 10*) and SMNΔTudor deleted of the amino acids encoded by exon 3 (amino acids 92–144)

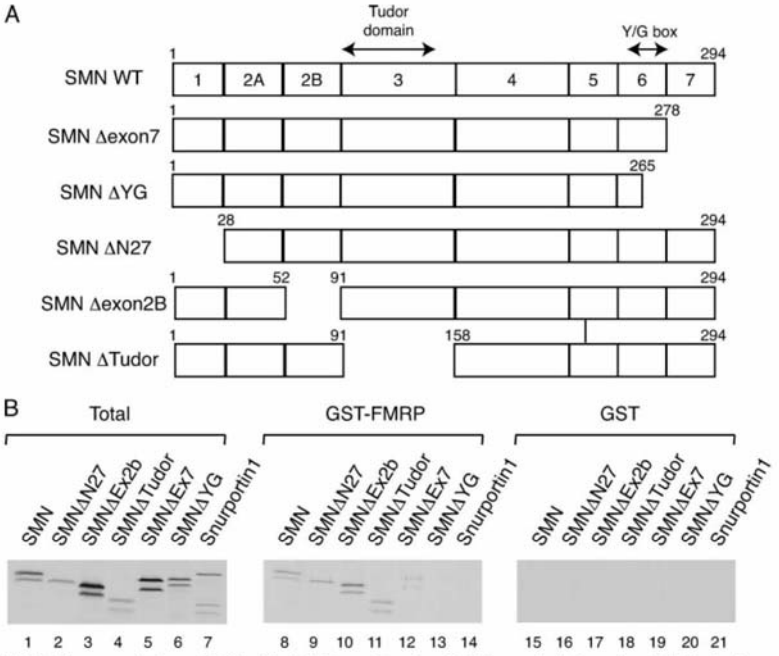


FIGURE 6. **The association of SMN with FMRP requires the COOH-terminal domain of SMN.** *A*, schematic representation of SMN wild-type and deletion mutants used in binding assays. Regions denoted *1–7* correspond to the regions encoded by exons 1–7. The Tudor domain and the YG box are indicated. *B*, *in vitro* translated [^{35}S]methionine-labeled wild-type SMN or the indicated mutants were incubated with recombinant GST-FMRP immobilized on beads (*lanes 8–14*), or with GST alone used as a negative control (*lanes 15–21*). Following extensive washes, the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The *Total* lanes show 10% of labeled proteins used in each binding reaction (*lanes 1–7*).

(Fig. 6, *lane 11*). In contrast, deletion of the COOH-terminal 26 amino acids of SMN (SMNΔYG), which encompasses the YG box, completely abolished the SMN interaction with FMRP (Fig. 6, *lane 13*). Moreover, we showed that SMN binding to FMRP is strongly reduced by deletion of the region encoded by exon 7 (SMNΔExon7, Fig. 6, *lane 12*). None of the tested proteins showed binding to GST (Fig. 6, *lanes 15–21*). These results demonstrated that the highly conserved YG box is necessary for SMN association with FMRP. Moreover, SMNΔEx7, the main product of the *SMN2* gene, is severely impaired in FMRP association.

DISCUSSION

Here, we show that the SMN and FMRP proteins, which both play a very important role in dendrite and axon morphogenesis and activity, interact *in vitro* and in extracts from the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and from the murine motor neuron MN1 cell line, and partially colocalize in cell bodies and processes of rat primary neurons of hypothalamus in culture. As discussed below, these results open the question of possible functional links between these two proteins in neuronal mRNA transport and translation regulation, and/or in the plasticity of actin cytoskeleton in growth cones and synapses.

SMN and FMRP May Interact Together in Neuronal mRNP Granules—The highly polarized neuronal cells use specific localization and translation of mRNAs to respond rapidly to a local requirement of specific proteins and to regulate gene expression independently in different parts of the cell. Translation of localized mRNAs in growth cones is crucial for axon guidance and synapse formation, and the local translation in dendrites contributes to synaptic plasticity (54–56, 58). The mRNAs are transported along neuronal processes in an untranslatable form within RNP granules (for reviews, see Refs. 116 and 117). Although FMRP is predominantly found in the cell body of neuronal cells, a small fraction is associated with trafficking mRNP granules in neuronal processes and is localized at growth cones and synapses (71, 72, 89, 90, 118, 119). As the knockout of the *FMR1* gene encoding FMRP induces subtle changes both in location and abundance of several neuronal specific mRNAs (120), FMRP was proposed to play a role for specific mRNA transport in neurons. Based on its ability to limit translation efficiency *in vitro*, FMRP was also proposed to be involved in silencing of some of the mRNAs that are transported in mRNP granules (for reviews, see Refs. 65 and 121). Previous studies have revealed a punctuate and granular distribution of SMN in the cytoplasm of neuronal cells. More precisely, its localization extends throughout processes and into growth cones (47, 51–53). SMN granules in neurites show frequent colocalization with ribosomal RNAs and lack spliceosomal Sm proteins (51, 53). The present data reveal the presence of granules containing either one or both of the SMN and FMRP proteins within cell bodies and processes of rat primary neurons of hypothalamus in culture. Therefore, a subset of these two proteins may be transported together in some of the granules. Based on our observation of an ability of FMRP to associate with SMN, we can imagine a physical association of the two proteins within the granules. It will be interesting to know whether colocalization of the two proteins in granules depends upon the domains required for their interaction. According to previous data, some of the SMN-containing granules also contain Gemin proteins (47, 52, 53). Therefore, our observation of the ability of FMRP to interact with the purified SMN complex and the *in vitro* translated SMN protein alone opens the question of an interaction of FMRP with SMN alone and/or the SMN complex in the neuronal granules.

FMRP was already shown to be part of large mRNP complexes containing several proteins that interact directly or indirectly with FMRP (for reviews, see Refs. 65 and 69). However, none of the proteins identified up to now corresponds to SMN. The absence of previous detection of the SMN protein may be due to the fact that not all of the FMRP-containing granules

contain SMN. Interestingly, beside FMRP, several proteins known to associate directly or indirectly with SMN were found to be present in RNA transport granules purified from neuronal and non-neuronal cells, *i.e.* hnRNP Q, hnRNP R, RNA helicase A, and nucleolin (49, 60, 122–128). It will be important to analyze whether these proteins are present in the FMRP/SMN-containing granules. Altogether, our observations suggest the existence of different classes of mRNP granules in neuronal processes or a dynamic composition of these granules.

Association of SMN and FMRP in mRNP Granules May Take Place in the Nucleus or Cytoplasm—Although FMRP is predominantly cytoplasmic, it may already interact with mRNAs in the nucleus and play an active role in the export of specific mRNAs in the cytoplasm. This hypothesis has been recently strengthened by the discovery of an interaction between FMRP and NXF2, an mRNA nuclear export factor (129). In neurons, once the FMRP-containing mRNP complexes reach the cytoplasm, they are directed to a so-called "triage center," which in turn directs them to be translated or to be transported to neurites as translationally silent mRNP granules (for review, see Ref. 65). FMRP associates with specific neuronal mRNAs either directly or indirectly through interaction with non-coding RNAs (64, 108, 130–135). As it has already been proposed for other FMRP-interacting proteins (65, 105), the SMN complex or the SMN protein alone may modulate the affinity of FMRP for different classes of mRNAs by inducing structural changes of the FMRP conformation.

Interestingly, Unrip, one of the components of the SMN complex, is also able to associate *in vitro* and *in vivo* with the mRNA nuclear export NXF family proteins (at least NXF1/TAP, NXF2, and NXF7), as well as with the brain-specific microtubule-associated protein MAP1B (136). The MAP1 family of proteins are supposed to be molecular adaptors linking specific proteins to microtubules (for review, see Ref. 137). It is therefore possible that the SMN complex via Unrip could play a role in coupling nuclear export of mRNP complexes mediated by NXF proteins with subsequent trafficking both in non-neuronal and neuronal cells (136). In addition, SMN together with its protein partner hnRNP R, were found to interact with β-actin mRNA and are both essential for transport of this mRNA to growth cones of motor neurons (49, 50). Furthermore, the SMN complex is known to be involved in U snRNP assembly and is expected to play a role in the assembly of other RNP complexes (for reviews, see Refs. 23–26). An interesting possibility is that the SMN complex plays a role in the assembly of some specific mRNPs, for instance, some FMRP-containing mRNPs.

Based on all these considerations and on the data presented in this work, we can imagine several scenario: (i) the SMN complex may be involved in assembly of FMRP-containing mRNPs in the nucleus and, either the entire complex, or the SMN protein alone, may remain bound to some of these mRNPs throughout their transport. By interaction with the NXF protein family, FMRP and the SMN complex may contribute together to the mRNP export from the nucleus, (ii) some of the mRNP complexes may be associated with only FMRP in the nucleus, FMRP interaction with NXF2 may facilitate nuclear export and then some of the exported mRNPs may bind to the SMN complex or the SMN protein in the cytoplasm, and (iii) vice versa, some mRNP complexes may be associated with the SMN complex in the nucleus, Unrip may favor export through its interaction with NXF proteins and FMRP may associate in the cytoplasm. A more thorough analysis of the granule content in the various cellular compartments will be required to choose among these various possibilities.

SMN and FMRP May Have Complementary Activities on Actin Filament Organization in Neurons—Whereas a large number of mRNAs have been identified *in vitro* and *in vivo* as potential FMRP targets (Refs. 83, 120, 131, and 132; for reviews, see Refs. 138 and 139), only an involvement of SMN in the transport and regulation of the translation of β-actin mRNA in axons have been described (49, 50). This regulation by SMN may be mediated by its interaction with hnRNP R that interact with β-actin mRNA *in vitro* (50). It was shown that hnRNP R overexpression enhances β-actin mRNA localization in axons and, conversely, reduced localization of β-actin mRNA and protein was detected in axonal growth cones of motor neurons cultured from the SMA transgenic mouse model (50). In addition to its role in β-actin production at growth cones, SMN was proposed to have a direct role in the regulation of actin polymerization through its interaction with profilin IIa (52, 140). Very interestingly, it was recently shown that dFMRP, the *Drosophila* homologue of FMRP, can bind the profilin mRNA and negatively regulate its translation (141). Moreover, FMRP was also proposed to play an important role in remodeling the actin cytoskeleton by its interaction with CYFIP1, a partner of the Rho GTPase Rac1 (101, 142, 143). The Rho GTPase pathway regulates actin dynamics in response to extracellular stimuli and is crucial in neurons for neurite outgrowth as well as for synapse development (for review, see Ref. 144). In addition, FMRP inhibits translation of the mRNA of the phosphatase 2A catalytic subunit (145), which is also a crucial effector of the Rac1 signaling pathway. Therefore, it is possible that the physical link that we discovered between SMN and FMRP plays a role in the synchronization of their functions on actin dynamic in dendrites and axons.

SMN and FMRP Interact Through Their COOH-terminal Domains—We showed that the COOH-terminal region of FMRP from positions 470 to 526 is essential for the association with SMN. Within this region, the RG/GR repeats (positions 470–485) seem to be important. However, in contrast to the Sm proteins or coilin (109–112), methylation of FMRP is not essential for the interaction. A similar observation was already made for SMN association with GAR1 and fibrillarin (146). Interestingly, an interaction of SMN with the COOH-terminal domain of FMRP is not expected to alter FMRP interaction with RNAs mediated by the KH domains, and with the FXR1P, FXR2P, CYFIP1, and CYFIP2 proteins. Indeed, these interactions require the region encoded by exon 7 of FMRP (100, 101). In addition, FMRP in association with SMN can probably self-associate because the dimerization domain is located also in the region encoded by exon 7 (100). However, as the region spanning amino acids 490–526 is necessary for MSP-58 binding (104) and the COOH-terminal region (amino acids 419 to 632) is needed for Ran-BPM binding (105), interaction of FMRP with these proteins may be exclusive of the SMN interaction. As the FMRP region necessary for its association with SMN

encompasses the FMRP phosphorylation domain (147–149), the level of FMRP phosphorylation may modulate *in vivo* the interaction with SMN. Importantly, truncated SMN proteins (SMNΔEx7 and SMNΔYG) that are expressed in patients suffering of SMA have no or very low capability to associate with FMRP. In conclusion, although the best known role of the SMN complex is its function in the assembly of U snRNP, recent studies (for reviews, see Refs. 2, 43, and 44) and the present data strongly suggest completely different additional roles of SMN in neuronal cells in localized translation and/or actin metabolism.

Acknowledgments—We thank G. Dreyfuss, L. Pellizzoni, and S. T. Warren for the gift of antibodies and plasmids. We are grateful to members of our laboratories, in particular Y. Motorin, V. Marchand, V. Senty-Ségault, and R. Bordonné for helpful discussions and comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Melki, J. (1997) *Curr. Opin. Neurol.* **10,** 381–385
2. Monani, U. R. (2005) *Neuron* **48,** 885–896
3. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frezal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., and Melki, J. (1995) *Cell* **80,** 155–165
4. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrandy, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., and Melki, J. (1997) *Nat. Genet.* **16,** 265–269
5. Coovert, D. D., Le, T. T., McAndrew, P. E., Strasswimmer, J., Crawford, T. O., Mendell, J. R., Coulson, S. E., Androphy, E. J., Prior, T. W., and Burghes, A. H. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6,** 1205–1214
6. Monani, U. R., Lorson, C. L., Parsons, D. W., Prior, T. W., Androphy, E. J., Burghes, A. H., and McPherson, J. D. (1999) *Hum. Mol. Genet.* **8,** 1177–1183
7. Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., and Wirth, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 6307–6311
8. Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S., and Dreyfuss, G. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* **14,** 305–312
9. Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1997) *Cell* **90,** 1013–1021
10. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R. A., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (1999) *J. Cell Biol.* **147,** 1181–1194
11. Campbell, L., Hunter, K. M., Mohaghegh, P., Tinsley, J. M., Brasch, M. A., and Davies, K. E. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9,** 1093–1100
12. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R. A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2000) *J. Cell Biol.* **148,** 1177–1186
13. Meister, G., Buhler, D., Laggerbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F., and Fischer, U. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9,** 1977–1986
14. Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F., and Fisher, U. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3,** 945–949
15. Gubitz, A. K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 5631–5636
16. Pellizzoni, L., Baccon, J., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 7540–7545
17. Baccon, J., Pellizzoni, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 31957–31962
18. Carissimi, C., Saieva, L., Baccon, J., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., and Pellizzoni, L. (2006) *J. Biol. Chem.* **281,** 8126–8134
19. Otter, S., Grimmler, M., Neuenkirchen, N., Chari, A., Sickmann, A., and Fischer, U. (2007) *J. Biol. Chem.* **282,** 5825–5833
20. Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1996) *EMBO J.* **15,** 3555–3565
21. Carissimi, C., Baccon, J., Straccia, M., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., and Pellizzoni, L. (2005) *FEBS Lett.* **579,** 2348–2354
22. Grimmler, M., Otter, S., Peter, C., Muller, F., Chari, A., and Fischer, U. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14,** 3099–3111
23. Gubitz, A. K., Feng, W., and Dreyfuss, G. (2004) *Exp. Cell Res.* **296,** 51–56
24. Eggert, C., Chari, A., Laggerbauer, B., and Fischer, U. (2006) *Trends Mol. Med.* **12,** 113–121
25. Meister, G., and Fischer, U. (2002) *EMBO J.* **21,** 5853–5863
26. Yong, J., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2004) *Trends Cell Biol.* **14,** 226–232
27. Will, C. L., and Luhrmann, R. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* **13,** 290–301
28. Fischer, U., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1997) *Cell* **90,** 1023–1029
29. Friesen, W. J., and Dreyfuss, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 26370–26375
30. Pellizzoni, L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2002) *Science* **298,** 1775–1779
31. Yong, J., Pellizzoni, L., and Dreyfuss, G. (2002) *EMBO J.* **21,** 1188–1196
32. Meister, G., Eggert, C., and Fischer, U. (2002) *Trends Cell Biol.* **12,** 472–478
33. Yong, J., Golembe, T. J., Battle, D. J., Pellizzoni, L., and Dreyfuss, G. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24,** 2747–2756
34. Golembe, T. J., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25,** 10989–11004
35. Battle, D. J., Lau, C. K., Wan, L., Deng, H., Lotti, F., and Dreyfuss, G. (2006) *Mol. Cell.* **23,** 273–279
36. Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I. W., and Dreyfuss, G. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22,** 6533–6541
37. Narayanan, U., Ospina, J. K., Frey, M. R., Hebert, M. D., and Matera, A. G. (2002) *Hum. Mol. Genet* **11,** 1785–1795
38. Mouaikel, J., Narayanan, U., Verheggen, C., Matera, A. G., Bertrand, E., Tazi, J., and Bordonne, R. (2003) *EMBO Rep.* **4,** 616–622
39. Narayanan, U., Achsel, T., Luhrmann, R., and Matera, A. G. (2004) *Mol. Cell* **16,** 223–234
40. Pillai, R. S., Grimmler, M., Meister, G., Will, C. L., Luhrmann, R., Fischer, U., and Schumperli, D. (2003) *Genes Dev.* **17,** 2321–2333
41. Winkler, C., Eggert, C., Gradl, D., Meister, G., Giegerich, M., Wedlich, D., Laggerbauer, B., and Fischer, U. (2005) *Genes Dev.* **19,** 2320–2330
42. Carrel, T. L., McWhorter, M. L., Workman, E., Zhang, H., Wolstencroft, E. C., Lorson, C., Bassell, G. J., Burghes, A. H., and Beattie, C. E. (2006) *J. Neurosci.* **26,** 11014–11022
43. Briese, M., Esmaeili, B., and Sattelle, D. B. (2005) *Bioessays* **27,** 946–957
44. Pellizzoni, L. (2007) *EMBO Rep.* **8,** 340–345
45. Bechade, C., Rostaing, P., Cisterni, C., Kalisch, R., La Bella, V., Pettmann, B., and Triller, A. (1999) *Eur. J. Neurosci.* **11,** 293–304
46. Pagliardini, S., Giavazzi, A., Setola, V., Lizier, C., Di Luca, M., DeBiasi, S., and Battaglia, G. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9,** 47–56
47. Jablonka, S., Bandilla, M., Wiese, S., Buhler, D., Wirth, B., Sendtner, M., and Fischer, U. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10,** 497–505
48. Fan, L., and Simard, L. R. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11,** 1605–1614
49. Rossoll, W., Kroning, A. K., Ohndorf, U. M., Steegborn, C., Jablonka, S., and Sendtner, M. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11,** 93–105
50. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A. K., Karle, K., Monani, U. R., and Sendtner, M. (2003) *J. Cell Biol.* **163,** 801–812
51. Zhang, H. L., Pan, F., Hong, D., Shenoy, S. M., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2003) *J. Neurosci.* **23,** 6627–6637
52. Sharma, A., Lambrechts, A., Hao le, T., Le, T. T., Sewry, C. A., Ampe, C., Burghes, A. H., and Morris, G. E. (2005) *Exp. Cell Res.* **309,** 185–197
53. Zhang, H., Xing, L., Rossoll, W., Wichterle, H., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2006) *J. Neurosci.* **26,** 8622–8632
54. Job, C., and Eberwine, J. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* **2,** 889–898
55. Steward, O. (2002) *Cell* **110,** 537–540
56. Twiss, J. L., and van Minnen, J. (2006) *J. Neurotrauma* **23,** 295–308
57. Willis, D. E., and Twiss, J. L. (2006) *Curr. Opin. Neurobiol.* **16,** 111–118
58. Pfeiffer, B. E., and Huber, K. M. (2006) *J. Neurosci.* **26,** 7147–7150
59. McWhorter, M. L., Monani, U. R., Burghes, A. H., and Beattie, C. E. (2003) *J. Cell Biol.* **162,** 919–931
60. Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001) *EMBO J.* **20,** 5443–5452
61. Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E. M., Ostareck-Lederer, A., and Fischer, U. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10,** 329–338
62. Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K. D., Warren, S. T., and Feng, Y. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29,** 2276–2283
63. Mazroui, R., Huot, M. E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., and Khandjian, E. W. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11,** 3007–3017
64. Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B., and Bagni, C. (2003) *Cell* **112,** 317–327
65. Bardoni, B., Davidovic, L., Bensaid, M., and Khandjian, E. W. (2006) *Exp. Rev. Mol. Med.* **8,** 1–16

66. Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., Bogerd, H. P., and Cullen, B. R. (1996) *EMBO J.* **15,** 5408–5414
67. Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., and Warren, S. T. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5,** 1083–1091
68. Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y., and Mandel, J. L. (1997) *Neurobiol. Dis.* **4,** 329–336
69. Bagni, C., and Greenough, W. T. (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* **6,** 376–387
70. Bear, M. F., Huber, K. M., and Warren, S. T. (2004) *Trends Neurosci.* **27,** 370–377
71. Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C., and Bassell, G. J. (2006) *Mol. Cell. Neurosci.* **32,** 37–48
72. Ferrari, F., Mercaldo, V., Piccoli, G., Sala, C., Cannata, S., Achsel, T., and Bagni, C. (2007) *Mol. Cell. Neurosci.* **34,** 343–354
73. Sittler, A., Devys, D., Weber, C., and Mandel, J. L. (1996) *Hum. Mol. Genet.* **5,** 95–102
74. Bardoni, B., Schenck, A., and Mandel, J. L. (1999) *Hum. Mol. Genet.* **8,** 2557–2566
75. Friesen, W. J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G. S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21,** 8289–8300
76. Pellizzoni, L., Kataoka, N., Charroux, B., and Dreyfuss, G. (1998) *Cell* **95,** 615–624
77. Paushkin, S., Charroux, B., Abel, L., Perkinson, R. A., Pellizzoni, L., and Dreyfuss, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 23841–23846
78. Pellizzoni, L., Charroux, B., and Dreyfuss, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 11167–11172
79. Carissimi, C., Saieva, L., Gabanella, F., and Pellizzoni, L. (2006) *J. Biol. Chem.* **282,** 37009–37016
80. Pinol-Roma, S., Choi, Y. D., Matunis, M. J., and Dreyfuss, G. (1988) *Genes Dev.* **2,** 215–227
81. Choi, Y. D., and Dreyfuss, G. (1984) *J. Cell Biol.* **99,** 1997–2004
82. Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., and Mandel, J. L. (1993) *Nat. Genet.* **4,** 335–340
83. Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B., and Warren, S. T. (2001) *Cell* **107,** 477–487
84. Lerner, M. R., and Steitz, J. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76,** 5495–5499
85. Rage, F., Riteau, B., Alonso, G., and Tapia-Arancibia, L. (1999) *Endocrinology* **140,** 909–916
86. Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K., and Greenberg, M. E. (1996) *J. Neurosci.* **16,** 5425–5436
87. Ma, Y., Dostie, J., Dreyfuss, G., and Van Duyne, G. D. (2005) *Structure* **13,** 883–892
88. Salazar-Grueso, E. F., Kim, S., and Kim, H. (1991) *Neuroreport* **2,** 505–508
89. De Diego Otero, Y., Severijnen, L. A., van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B., and Willemsen, R. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22,** 8332–8341
90. Antar, L. N., Afroz, R., Dictenberg, J. B., Carroll, R. C., and Bassell, G. J. (2004) *J. Neurosci.* **24,** 2648–2655
91. Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., and Lockett, S. (2004) *Biophys. J.* **86,** 3993–4003
92. Hua, Y., and Zhou, J. (2004) *FEBS Lett.* **572,** 69–74
93. Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., Dugue, A., Schweighoffer, F., and Tocque, B. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16,** 2561–2569
94. Gallouzi, I. E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., Capony, J. P., Tocque, B., and Tazi, J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18,** 3956–3965
95. Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003) *J. Cell Biol.* **160,** 823–831
96. Lorson, C. L., and Androphy, E. J. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7,** 1269–1275
97. Young, P. J., Man, N. T., Lorson, C. L., Le, T. T., Androphy, E. J., Burghes, A. H., and Morris, G. E. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9,** 2869–2877
98. Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1993) *Cell* **74,** 291–298
99. Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D., and Warren, S. T. (1993) *Science* **262,** 563–566
100. Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16,** 3825–3832
101. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., and Mandel, J. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 8844–8849
102. Bardoni, B., Castets, M., Huot, M. E., Schenck, A., Adinolfi, S., Corbin, F., Pastore, A., Khandjian, E. W., and Mandel, J. L. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12,** 1689–1698
103. Ramos, A., Hollingworth, D., Adinolfi, S., Castets, M., Kelly, G., Frenkiel, T. A., Bardoni, B., and Pastore, A. (2006) *Structure* **14,** 21–31
104. Davidovic, L., Bechara, E., Gravel, M., Jaglin, X. H., Tremblay, S., Sik, A., Bardoni, B., and Khandjian, E. W. (2006) *Hum. Mol. Genet.* **15,** 1525–1538
105. Menon, R. P., Gibson, T. J., and Pastore, A. (2004) *J. Mol. Biol.* **343,** 43–53
106. De Boulle, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1993) *Nat. Genet.* **3,** 31–35
107. Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D. E., Brown, V., Malter, H. E., and Warren, S. T. (1997) *Mol. Cell* **1,** 109–118
108. Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., and Darnell, R. B. (2005) *Genes Dev.* **19,** 903–918
109. Friesen, W. J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss, G. (2001) *Mol. Cell* **7,** 1111–1117
110. Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Luhrmann, R. (2001) *RNA* (*Cold Spring Harbor*) **7,** 1531–1542
111. Hebert, M. D., Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E., and Matera, A. G. (2002) *Dev. Cell* **3,** 329–337
112. Boisvert, F. M., Cote, J., Boulanger, M. C., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., and Richard, S. (2002) *J. Cell Biol.* **159,** 957–969
113. Stetler, A., Winograd, C., Sayegh, J., Cheever, A., Patton, E., Zhang, X., Clarke, S., and Ceman, S. (2006) *Hum. Mol. Genet.* **15,** 87–96
114. Dolzhanskaya, N., Merz, G., and Denman, R. B. (2006) *Biochemistry* **45,** 10385–10393
115. Wirth, B. (2000) *Hum. Mutat.* **15,** 228–237
116. Wells, D. G. (2006) *J. Neurosci.* **26,** 7135–7138
117. Kiebler, M. A., and Bassell, G. J. (2006) *Neuron* **51,** 685–690
118. Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T., and Hersch, S. M. (1997) *J. Neurosci.* **17,** 1539–1547
119. Weiler, I. J., Irwin, S. A., Klintsova, A. Y., Spencer, C. M., Brazelton, A. D., Miyashiro, K., Comery, T. A., Patel, B., Eberwine, J., and Greenough, W. T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 5395–5400
120. Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., Carbonetto, S., Weiler, I. J., Greenough, W. T., and Eberwine, J. (2003) *Neuron* **37,** 417–431
121. Garber, K., Smith, K. T., Reines, D., and Warren, S. T. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16,** 270–275
122. Pellizzoni, L., Charroux, B., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2001) *J. Cell Biol.* **152,** 75–85
123. Lefebvre, S., Burlet, P., Viollet, L., Bertrandy, S., Huber, C., Belser, C., and Munnich, A. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11,** 1017–1027
124. Jonson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L. K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A. H., Christiansen, J., and Nielsen, F. C. (2007) *Mol. Cell. Proteomics* **6,** 798–811
125. Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A. W., Boismenu, D., Lacaille, J. C., McPherson, P. S., DesGroseillers, L., and Sossin, W. S. (2006) *Mol. Cell. Proteomics* **5,** 635–651
126. Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004) *Neuron* **43,** 513–525
127. Villace, P., Marion, R. M., and Ortin, J. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32,** 2411–2420
128. Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004) *Biochem. J.* **384,** 239–246
129. Lai, D., Sakkas, D., and Huang, Y. (2006) *RNA* (*Cold Spring Harbor*) **12,** 1446–1449
130. Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J. L., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Moine, H. (2001) *EMBO J.* **20,** 4803–4813
131. Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., and Darnell, R. B. (2001) *Cell* **107,** 489–499
132. Chen, L., Yun, S. W., Seto, J., Liu, W., and Toth, M. (2003) *Neuroscience*

120, 1005–1017
133. Dolzhanskaya, N., Sung, Y. J., Conti, J., Currie, J. R., and Denman, R. B. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305,** 434–441
134. Zalfa, F., Adinolfi, S., Napoli, I., Kuhn-Holsken, E., Urlaub, H., Achsel, T., Pastore, A., and Bagni, C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 33403–33410
135. Siomi, H., Ishizuka, A., and Siomi, M. C. (2004) *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **10,** 68–74
136. Tretyakova, I., Zolotukhin, A. S., Tan, W., Bear, J., Propst, F., Ruthel, G., and Felber, B. K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 31981–31990
137. Halpain, S., and Dehmelt, L. (2006) *Genome Biol.* **7,** 224
138. Jin, P., and Warren, S. T. (2003) *Trends Biochem. Sci* **28,** 152–158
139. Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Moine, H. (2003) *Biol. Cell* **95,** 221–228
140. Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J. W., Buchmeier, S., Jockusch, B. M., and Jockusch, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 37908–37914
141. Reeve, S. P., Bassetto, L., Genova, G. K., Kleyner, Y., Leyssen, M., Jackson, F. R., and Hassan, B. A. (2005) *Curr. Biol.* **15,** 1156–1163
142. Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 291–295
143. Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J. L., and Giangrande, A. (2003) *Neuron* **38,** 887–898
144. Watabe-Uchida, M., Govek, E. E., and Van Aelst, L. (2006) *J. Neurosci.* **26,** 10633–10635
145. Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., Khandjian, E. W., Luche, S., Moine, H., Rabilloud, T., Mandel, J. L., and Bardoni, B. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14,** 835–844
146. Whitehead, S. E., Jones, K. W., Zhang, X., Cheng, X., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 48087–48093
147. Siomi, M. C., Higashijima, K., Ishizuka, A., and Siomi, H. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22,** 8438–8447
148. Ceman, S., O'Donnell, W. T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J., and Warren, S. T. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12,** 3295–3305
149. Mazroui, R., Huot, M. E., Tremblay, S., Boilard, N., Labelle, Y., and Khandjian, E. W. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12,** 3087–3096
150. Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Kunst, C. B., Leiner, H. A., Eichler, E. E., Nelson, D. L., and Warren, S. T. (1993) *Nat. Genet.* **4,** 244–251

The Journal of Biological Chemistry

SUPPLEMENTAL DATA

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 suppl data. **Transient expression of SMN-RFP does not induce stress granule formation in rat primary neurons of hypothalamus in culture.** Rat primary neurons of hypothalamus were transfected with plasmid expressing SMN-RFP fusion protein. Untreated cells (column Control), or cells treated with 0.5 mM arsenite for 1 hour (column Ars 1h), were permeabilized and fixed. Localization of SMN-RFP is shown in A. B is an immunofluorescence experiment using an anti-G3BP antibody. The combined images are shown in C. Stress granule formation was observed in SMN-RFP expressing cells only after arsenite treatment (column Ars 1 h, Panels B and C).

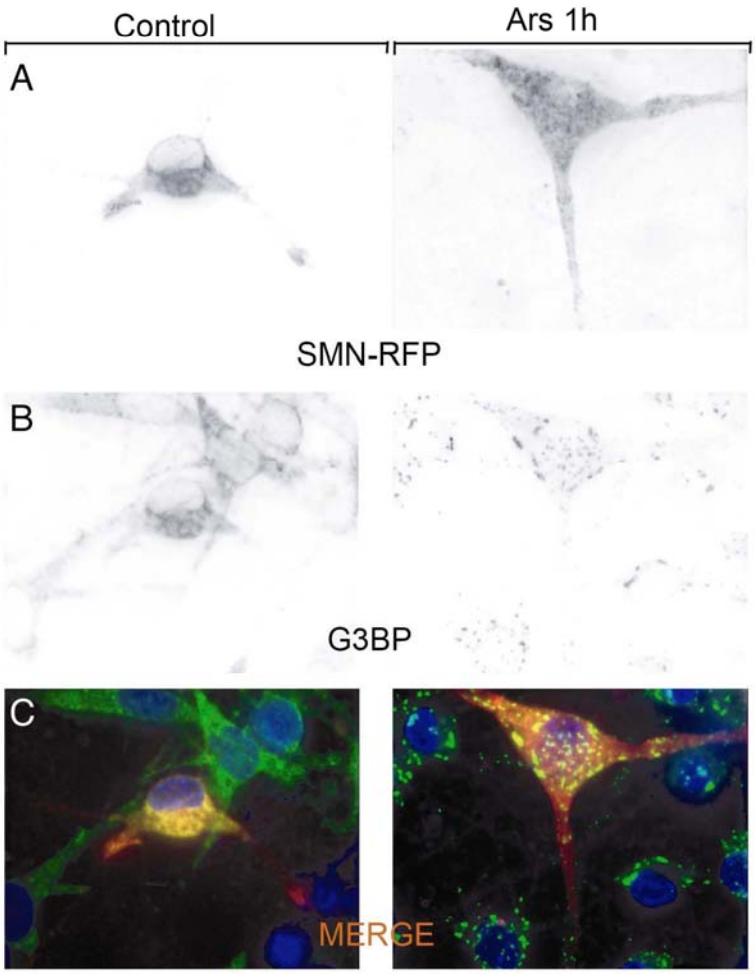


Figure 1 suppl. data
Piazzon et al.

III/ Résultats complémentaires

1/ La protéine SMN s'associe, in vitro, avec les protéines FXR1P et FXR2P

Comme décrit en introduction, la protéine FMRP fait partie d'une famille de protéines contenant les protéines FXR1P et FXR2P, qui ont également été décrites chez l'homme (Zhang et al, 1995). Il était intéressant de tester si ces deux protéines avaient, elles aussi, la capacité d'interagir avec le complexe SMN. Des plasmides contenant les cDNA de ces deux protéines nous ont été fournis par H. Moine (IGBMC, Strasbourg, France), ce qui nous a permis de les produire dans des extraits de réticulocytes de lapin, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Ces protéines avaient été incubées avec la protéine recombinante de fusion GST-SMN fixées à des billes de sépharose couplées au glutathion. Nous avons ainsi montré leur capacité d'interaction avec la protéine SMN ***(Figure 47)***. Les trois protéines de la famille des protéines FXR sont donc capables d'interagir avec la protéine SMN.

2/ Une petite fraction de protéines SMN co-sédimente avec la protéine FMRP dans les fractions correspondant aux polyribosomes

La présence de la protéine SMN dans des granules les long des neurites pourrait non seulement être liée au transport des ARNm, mais aussi à un rôle possible dans la traduction des ARNm. Afin de répondre à cette question, nous avons débuté une nouvelle collaboration avec B. Bardoni et L. Davidovic (IPMC, Valbonne, France). L. Davidovic a préparé des extraits cytoplasmiques à partir de cellules provenant d'une lignée de neuroblastomes de rat (NG108). Ces extraits ont ensuite été fractionnés sur gradient de saccharose. La présence des protéines SMN et FMRP dans chacune des fractions a ensuite été recherchée par Western-Blot ***(Figure 48 A/)***. Comme attendu, la protéine FMRP sédimente dans les fractions correspondant aux polyribosomes en présence de Mg^{2+} ***(Figure 48 A/, fractions 10 et 11, panneau supérieur)***. Inversement, en présence d'EDTA, qui induit la dissociation des ribosomes, la protéine FMRP se retrouve dans des fractions de coefficient de sédimentation plus faibles correspondant aux RNP qui ont été relarguées des ribosomes

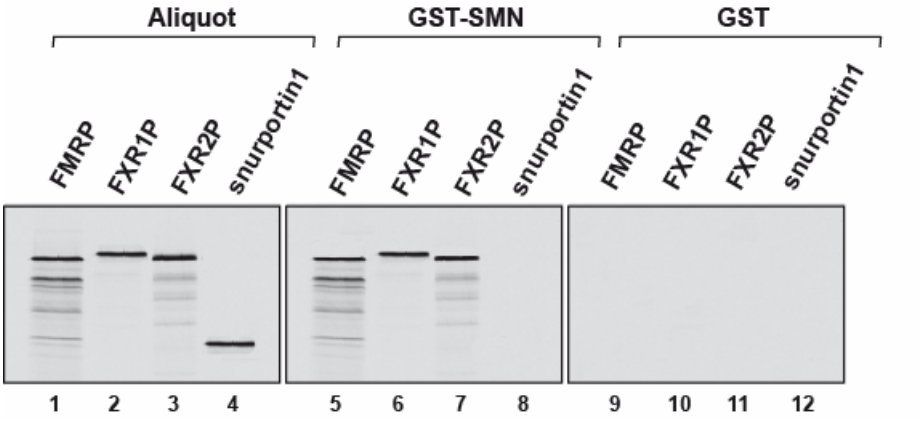


Figure 47 : Les 3 protéines de la famille des protéines FXR interagissent *in vitro* avec la protéine SMN

Les protéines FMRP, FXR1P, FXR2P et snurportin-1 ont été produites en présence de [^{35}S]-méthionine dans des extraits de réticulocytes de lapin selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Ces protéines ont ensuite été incubées avec les protéines recombinantes GST-SMN (pistes 5 à 8) et GST (pistes 9 à 12) produites chez *E. coli*, purifiée et fixée sur billes de sépharose couplées au glutathion selon les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Après plusieurs lavages, les protéines immunosélectionnées ont été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE 12% et révélées par fluorographie. Aliquot correspond à 10% de la quantité de protéines radioactives utilisées pour chaque réaction (pistes 1 à 4).

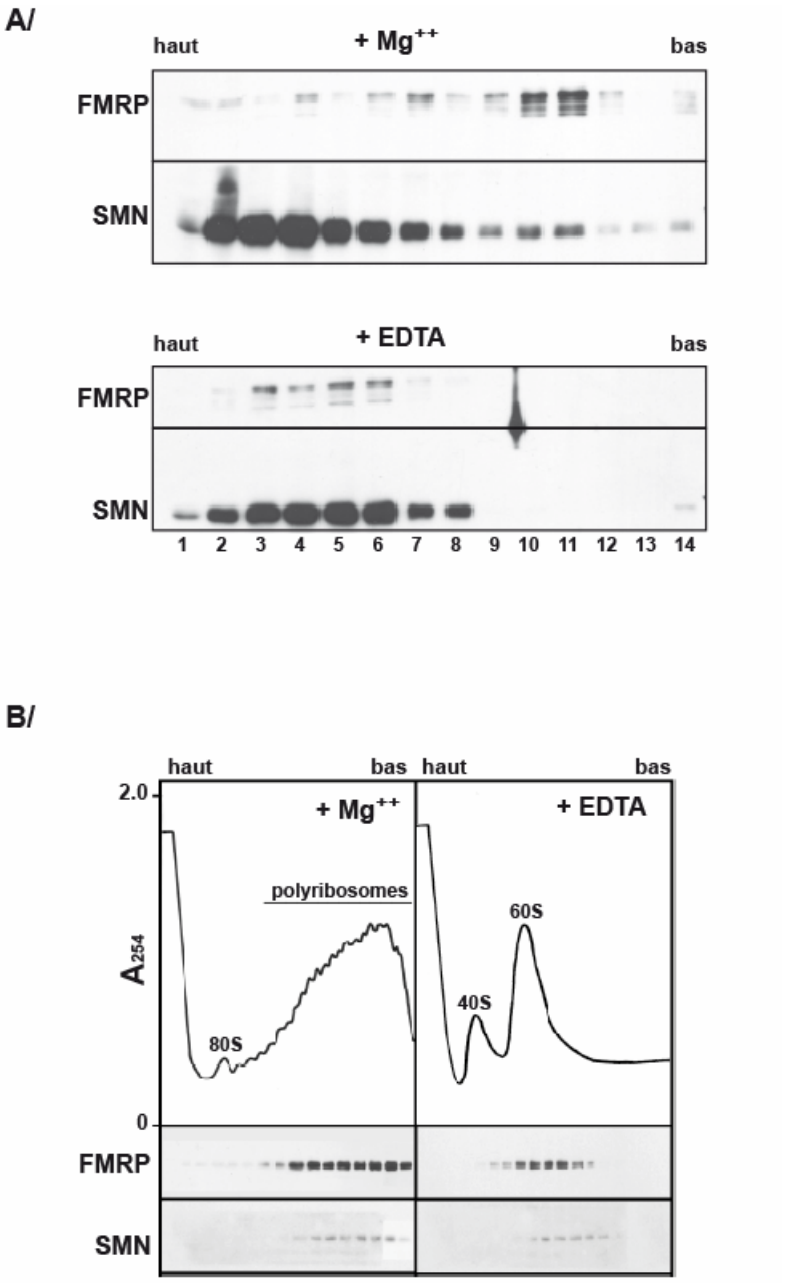


Figure 48 : Une fraction de protéines SMN dans les polyribosomes

A/ Analyse par ultracentrifugation en gradient de saccharose d'un extrait cytoplasmique préparé à partir de cellules provenant d'une lignée de neuroblastomes de souris NG108. En présence de Mg^{2+}, la majorité des protéines SMN se retrouve dans les fractions du gradient correspondant à un coefficient de sédimentation d'environ 80 S (fractions 2 à 6). Cependant, une petite sous-population de RNP contenant SMN se retrouve dans les polyribosomes avec FMRP (fractions 8 à 14). En présence d'EDTA, les protéines SMN et FMRP se déplacent dans les fractions correspondant aux RNP libres et aux RNP associées aux sous-unités 40 S et 60 S (fractions 1 à 8). **B/** Polyribosomes de souris purifiés par centrifugation d'un extrait cytoplasmique de cerveau et analysés par ultracentrifugation en gradient de saccharose. En présence de Mg^{2+}, SMN co-sédimente dans les mêmes fractions que FMRP. En présence d'EDTA, SMN, comme FMRP sont présntes dans des fractions ayant un coefficient de sédimentation plus faible.

(Figure 48 A/, fractions 3 à 6). En présence de Mg^{2+}, la majorité des protéines SMN se retrouve dans les fractions du gradient correspondant à un coefficient de sédimentation d'environ 80 S ***(Figure 48 A/, fractions 2 à 6)***. Cependant, de manière intéressante, une petite sous-population de protéines SMN co-sédimente avec la protéine FMRP dans les fractions correspondant aux polyribosomes. En présence d'EDTA, la protéine SMN se déplace dans les fractions plus légères correspondant aux RNP libres. Cette expérience suggère fortement la présence de la protéine SMN dans les polyribosomes. Cette hypothèse a été confirmée par la détection de la protéine SMN dans des polyribosomes purifiés à partir d'extraits de cerveaux de rats et fractionnés par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Cette expérience permet de ne visualiser que les protéines véritablement associées aux polyribosomes ***(Figure 48 B/)***.

IV/ Conclusions et perspectives de cette étude

Dans cette étude, nous avons montré l'existence d'un lien physique entre les protéines SMN et FMRP, qui jouent toutes les deux des rôles très importants dans les dendrites et dans l'activité et la morphogenèse des axones. Ces résultats ouvrent, alors, la possibilité d'un lien fonctionnel entre ces deux protéines dans le transport et/ou la régulation de la traduction de certains ARNm neuronaux.

Comme décrit en introduction, les neurones sont le siège d'une intense circulation et les mécanismes de transport y sont particulièrement importants du fait de leur anatomie adaptée à l'échange d'informations à longue distance. Ce transport joue deux grands rôles : (i) amener au niveau des cônes de croissance les molécules nécessaires à la synthèse protéique et donc permettre la croissance des axones, (ii) assurer la transmission entre neurones et l'établissement des connections synaptiques ce qui implique aussi une traduction localisée et la mobilité des molécules. L'ensemble des ces processus se traduit par le transport d'un grand nombre de granules qui ont des fonctions diverses et donc une hétérogénéité en composition. Ainsi, il n'est donc pas étonnant que les granules contenant la protéine SMN soient aussi hétérogènes. De plus, seules des co-localisations partielles ont été décrites avec la

protéine FMRP (SMN : notre étude ; KSRP : (Tadesse et al, 2008), les autres protéines du complexe SMN : (Jablonka et al, 2001 ; Sharma et al, 2005 ; Zhang et al, 2006).

1/ Analyse des granules neuronaux contenant la protéine SMN

La découverte d'une interaction directe entre les protéines SMN et FMRP et, par ailleurs, l'observation d'une interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN entier, n'implique pas une interaction systématique de la protéine FMRP avec la protéine SMN lorsqu'elle est présente au sein du complexe. Cela montre, par contre, que l'interaction qui peut se mettre en place entre les deux protéines isolées est compatible avec l'architecture et l'accessibilité de la protéine SMN au sein du complexe. On peut donc imaginer que dans une cellule, la protéine FMRP puisse interagir avec soit la protéine SMN seule soit avec la protéine SMN au sein du complexe SMN, ceci compte tenu des nécessités fonctionnelles.

Les travaux antérieurs de plusieurs équipes ont montré que certains granules neuronaux contiennent la protéine SMN seule, mais que d'autres peuvent également contenir une ou plusieurs protéines du complexe SMN (Jablonka et al, 2001 ; Sharma et al, 2005 ; Zhang et al, 2006). Dans un premier temps, il nous paraît donc très important de tester si la co-localisation des protéines SMN et FMRP que nous avons observée dans certains granules neuronaux s'accompagne d'une co-localisation avec les autres protéines du complexe SMN. Ces expériences pourront être réalisées en collaboration avec F. Rage (IGMM, Montpellier, France) sur des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture.

Dans un second temps, toujours dans le but de caractériser la nature de la co-localisation observée entre les protéines SMN et FMRP, il sera important de vérifier si cette co-localisation reflète une interaction directe. Pour répondre à cette question, plusieurs approches peuvent être envisagées. L'une d'elles est la technique de FRET *(Fluorescence Resonance Energy Transfer)*, une technique qui a déjà été utilisée pour identifier et quantifier les interactions moléculaires entre certaines Gemins et la protéine SMN au sein de granules neuronaux (Zhang et al, 2006). Cette technique met en œuvre deux fluorochromes, un donneur et un accepteur dont les propriétés spectrales et la proximité moléculaire permettent un transfert d'énergie. Une seconde approche sera de surexprimer, dans les neurones en

culture, des protéines SMN ou FMRP mutées dans les domaines qui leur sont nécessaires à l'établissement d'une interaction. Dans ce cas, on s'attend à voir une diminution du taux de co-localisation des deux protéines s'il y a, effectivement, une interaction directe.

La composition en protéines des granules contenant les protéines SMN et FMRP pourra également être analysée. En effet, il serait intéressant de tester si les partenaires protéiques de la protéine FMRP, déjà identifiés : FRX1P, FRX2P, NUFIP, CYFIP1 et CYFIP2, 82-FIP et MSP58 (pour revues, Bagni & Greenough, 2005 ; Bardoni et al, 2006), co-localisent avec la protéine SMN dans les granules et si ces protéines ont la capacité à interagir avec le complexe SMN. Cette expérience est d'autant plus intéressante à réaliser que nous avons déjà montré une interaction, *in vitro*, des protéines FRX1P et FRX2P avec la protéine SMN ***(Figure 47, page 193)***. Pour compléter cette étude, nous testerons si les domaines d'interaction mis en jeu dans l'interaction avec la protéine SMN sont les mêmes pour les 3 protéines.

Sur la base de la co-localisation partielle de la protéine SMN avec les protéines KSRP, hnRNPQ et R, déjà mise en évidence, il serait également intéressant de savoir si au sein des granules de transport ces 4 protéines sont retrouvées ensemble ou si au contraire, il existe des combinaisons plus spécifiques de protéines. Ainsi, on peut imaginer trouver des granules contenant les protéines hnRNPQ/R et SMN ou SMN et FMRP suivant le type d'ARNm transporté. En effet, il n'est pas exclu que le complexe SMN ou la protéine SMN puisse, indépendamment de la protéine FMRP, intervenir dans l'assemblage et/ou le transport de certains granules à ARN.

La réalisation de ces études devrait apporter des élémentS d'informations orientant nos travaux futurs vers des études fonctionnelles. L'idéal pour aller plus loin dans la connaissance des granules contenant les protéines SMN et FMRP serait de les purifier et de caractériser leur composition en protéines par spectrométrie de masse et leur composition en ARN par Northern-Blot et par RT-PCR.

2/ Rôle possible de la protéine SMN dans le transport et/ou la formation des mRNP contenant la protéine FMRP

Il a été proposé que la protéine FMRP s'associe aux ARNm dont elle régule la traduction, dans le noyau et les accompagne, ensuite, dans le cytoplasme (pour revue, Bardoni et al, 2006). On pourrait imaginer que le complexe SMN participe à l'assemblage de ces mRNP au sein du noyau et que soit le complexe SMN, soit la protéine SMN ou une partie de ce complexe suive les ARNm jusqu'à leur destination finale. Si le complexe SMN intervient dans la biogenèse des mRNP, l'interaction entre les protéines SMN et FMRP doit s'établir d'abord dans le noyau ***(Figure 49)***. La réponse à cette question pourra être apportée grâce à la surexpression d'un mutant FMRPΔNES, qui reste localisé dans le noyau. Cette expérience nous permettra de déterminer, par immunosélection, si l'interaction entre les protéines SMN et FMRP s'établit effectivement dans ce compartiment cellulaire.

L'expression de protéines SMN, mutées dans leur domaine d'interaction avec FMRP, devrait, également, apporter des informations sur l'importance potentielle du complexe SMN ou de la protéine SMN dans la formation et/ou le transport des mRNP associées à la protéine FMRP. Afin d'obtenir plus d'informations quant au comportement des protéines FMRP/SMN dans les neurones, il sera possible d'analyser leur co-transport en utilisant des protéines de fusion GFP-FMRP et SMN-RFP, exprimées transitoirement dans des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture et de suivre leurs déplacementS en temps réel. Cette expérience permettra de déterminer si les deux protéines sont transportées ensemble le long des prolongements neuronaux et de préciser où et comment ces deux protéines sont recrutées au sein des granules.

F. Rage a mis au point l'emploi de l'approche de l'ARN interférence pour diminuer fortement le taux de protéines SMN dans les neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture. Il serait donc intéressant de comparer la localisation de la protéine FMRP dans ces neurones et dans des neurones sauvages, afin de vérifier si le transport de FMRP est affecté ou non par une diminution du taux de protéine SMN.

Un argument en faveur d'un rôle possible du complexe SMN dans l'export et le transport des mRNP associées à FMRP est que Unrip, un des composant du complexe SMN, est capable de s'associer à des protéines d'export nucléaire de la famille des protéines

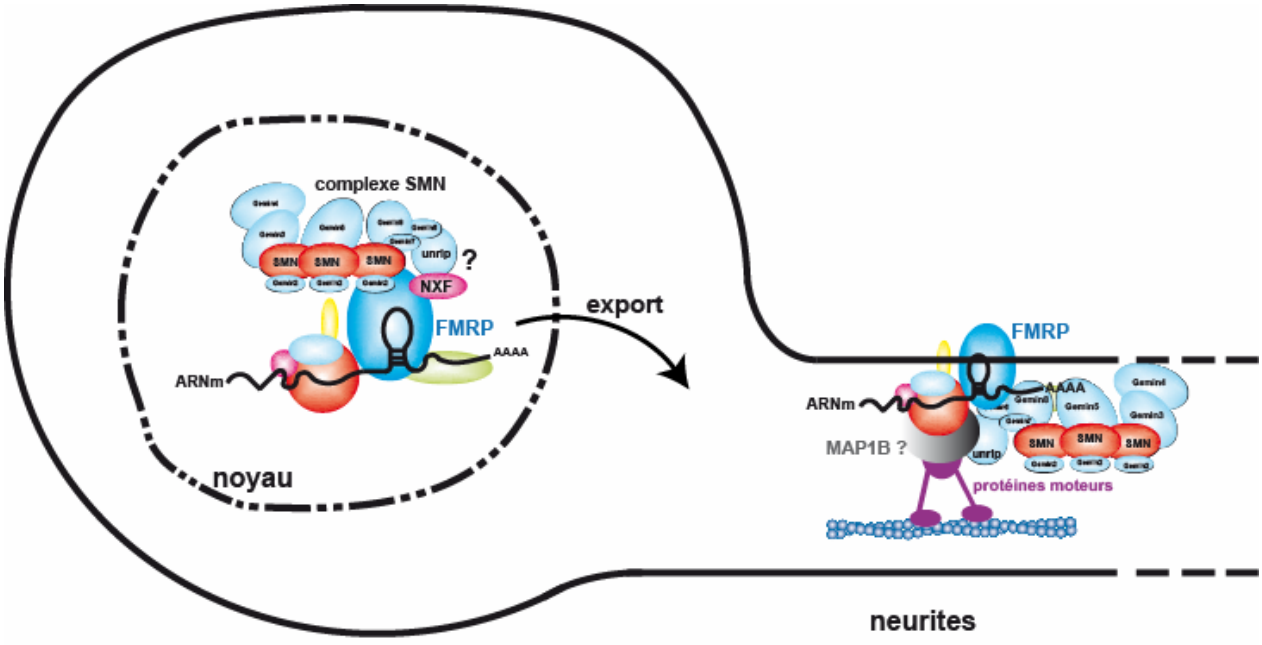


Figure 49 : Représentation schématique du rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage et l'export des mRNP associées à FMRP, dans les neurones

Selon ce modèle, le complexe SMN, via unrip, pourrait jouer un rôle dans l'export vers le cytoplasme des mRNP, associées à la protéine FMRP, ceci en fixant la protéine d'export nucléaire NXF2. Il est également possible que unrip permette le couplage entre l'export des mRNP et leur transport le long des neurites. En effet, unrip interagit avec MAP1B, une protéine de la famille des protéines MAP1, qui sont des protéines adaptatrices liant certaines protéines aux microtubules.

NXF (au moins NXF1/TAP, NXF2 et NXF7) (Tretyakova et al, 2005). La protéine FMRP interagit avec NXF2 (Lai et al, 2006). On peut donc imaginer que le complexe SMN, via unrip, puisse jouer un rôle dans l'export, vers le cytoplasme, des mRNP associées à la protéine FMRP ***(Figure 49)***. Il est également possible que unrip permette le couplage entre l'export des mRNP et leur transport le long des neurites. En effet, unrip interagit avec MAP1B (Tretyakova et al, 2005), une protéine de la famille des protéines MAP1 qui sont des protéines adaptatrices liant certaines protéines aux microtubules (pour revue, Halpain & Dehmelt, 2006).

3/ Rôle possible de la protéine SMN dans la régulation de la traduction des ARNm dépendante de la protéine FMRP

Comme décrit en introduction, la présence des protéines SMN et FMRP dans des granules le long des axones et des dendrites suggère que ces deux protéines participent à la régulation de la traduction. On sait que la protéine FMRP s'associe aux polyribosomes (Khandjian et al, 1996 ; Siomi et al, 1996 ; Tamanini et al, 1996 ; Corbin et al, 1997 ; Feng et al, 1997). Nous nous sommes donc posé la question suivante : la protéine SMN s'associe t-elle, également, aux polyribosomes ? Nos premières expériences ont déjà apporté un début de réponse. En effet, les premiers résultats obtenus par L. Davidovic et illustrés sur la ***figure 48***, suggèrent fortement la présence d'une fraction de protéines SMN dans les polyribosomes. Ces premiers résultats devront être vérifiés. De plus, nous pourrons tester l'association de la protéine SMN aux mRNP purifiées à l'aide de colonnes contenant des oligonucléotides dT et en utilisant des extraits totaux de cellules ou des fractions enrichies en polyribosomes. Ces expériences seront, également, réalisées en collaboration avec B. Bardoni et L. Davidovic. Nous envisageons, également, d'analyser si les autres protéines du complexe SMN sont présentes dans les polyribosomes. Malheureusement, la plupart des anticorps, actuellement à notre disposition, sont dirigés contre les protéines humaines du complexe SMN et ne reconnaissent pas les protéines murines. Par conséquent, nous pourrons envisager de produire de nouveaux anticorps dirigés contre les protéines murines du complexe SMN. A défaut, nous analyserons le profil de sédimentation par ultracentrifugation en gradient de saccharose de chaque protéine du complexe SMN au sein d'extraits de neuroblastomes humains (lignée SH-

SY5Y). Les protéines Gemin 3 et Gemin 4, qui s'associent aux miRNA et au facteur eIF2C2, au sein des miRNP (Nelson et al, 2004), ont déjà été observées dans les polyribosomes. Ces deux protéines pourront, par conséquent, nous servir de témoin pour nos expériences futures.

Pour tester le rôle possible de la protéine SMN dans la traduction localisée, dans les neurones, nous pourrons utiliser la technique d'ARN interférence dirigée contre la protéine SMN. Cette technique, déjà mise au point par F. Rage, nous permettra d'analyser si la réduction de la quantité de protéines SMN induit une réduction du taux de polyribosomes et de leur contenu en ARNm. Finalement, un marquage métabolique pourra être réalisé afin de comparer le taux d'acides aminés dans les synaptoneurosomes en conditions normales et en absence de la protéine SMN.

L'ensemble de ces travaux apportera des informations sur la participation possible de la protéine SMN et/ou du complexe SMN dans la régulation de la traduction des ARNm neuronaux.

Chapitre II : Caractérisation des interactions de l'ARN neuronal BC200 avec le complexe SMN et la protéine hnRNP-A2

A/ Mise en évidence et caractérisation des capacités d'interaction de l'ARN neuronal BC200 avec le complexe SMN

I/ Intérêt de l'étude

Comme décrit en introduction, même si la question d'une interaction directe entre l'ARN neuronal BC200 et la protéine FMRP reste posée, un lien fonctionnel pourrait exister entre les deux. Après avoir montré une interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN *(notre précédente étude)*, il était intéressant de tester l'existence d'une interaction entre l'ARN BC200 et le complexe SMN. Cette étude s'imposait d'autant plus que des expériences préliminaires réalisées par S. Massenet, au cours de son stage post-doctoral dans l'équipe de G. Dreyfuss, suggéraient fortement l'existence d'une telle interaction. Dans un premier temps, j'ai donc confirmé ce résultat et essayé, ensuite, d'apporter des informations afin d'étudier le mode d'interaction du complexe SMN avec l'ARN BC200. Notre objectif était d'identifier les domaines de cet ARN requis dans cette interaction ce qui pouvait permettre d'apporter des informations quant à la connaissance du mode d'interaction du complexe SMN avec les ARN auxquels il s'associe. Cette étude a également nécessité une analyse expérimentale de la structure secondaire de l'ARN BC200, ce qui n'avait encore jamais été fait.

II/ Résultats obtenus

1/ Etude in vitro des capacités d'interaction de l'ARN BC200 avec le complexe SMN

1.1/ Mise en évidence d'une interaction in vitro

Le principe de l'expérience était de tester si les ARN BC200 humain et BC1 murin peuvent interagir avec le complexe SMN, purifié à partir de cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2. La purification du complexe a été réalisée comme décrit dans l'étude précédente. Deux ARN, les snRNA U1 et U6, ont été respectivement utilisés comme contrôles positif et négatif. En effet, le snRNA U1 est connu pour interagir avec le complexe SMN contrairement au snRNA U6 (Yong et al, 2002 ; Yong et al, 2004a). Les différents ARN testés ont été produits par transcription *in vitro* avec marquage par incorporation d'UTP [α^{32}-P], comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les ARN fixés au complexe SMN ont été élués et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Les résultats obtenus sont illustrés dans la ***figure 50 A/)***. Comme attendu, le complexe SMN purifié interagit avec le snRNA U1 **(*figure 50 A/,* piste 7)**, mais pas avec le snRNA U6 **(*figure 50 A/,* piste 8)**. L'interaction avec le snRNA U1 est spécifique au complexe SMN, puisqu'aucune interaction n'a été détectée dans l'expérience contrôle réalisée avec un extrait de cellules HeLa n'exprimant pas la protéine Flag-Gemin2 **(*figure 50 A*/, Exp. contrôle)**. De plus, nos résultats montrent que le complexe SMN interagit avec l'ARN BC200 **(*figure 50 A/,* piste 5)** mais pas avec son homologue murin, l'ARN BC1 **(*figure 50 A/,* piste 6)**. Cette différence n'est pas surprenante car bien que ces ARN soient supposés jouer des rôles similaires, ils ont des origines évolutives et des séquences très différentes.

1.2/ L'ARN BC200 n'entre pas en compétition avec les UsnRNA pour sa fixation au complexe SMN

La question se posait alors de savoir si l'ARN BC200 a un site de fixation sur le complexe SMN identique ou recouvrant l'un des sites de fixation des UsnRNA. Afin de

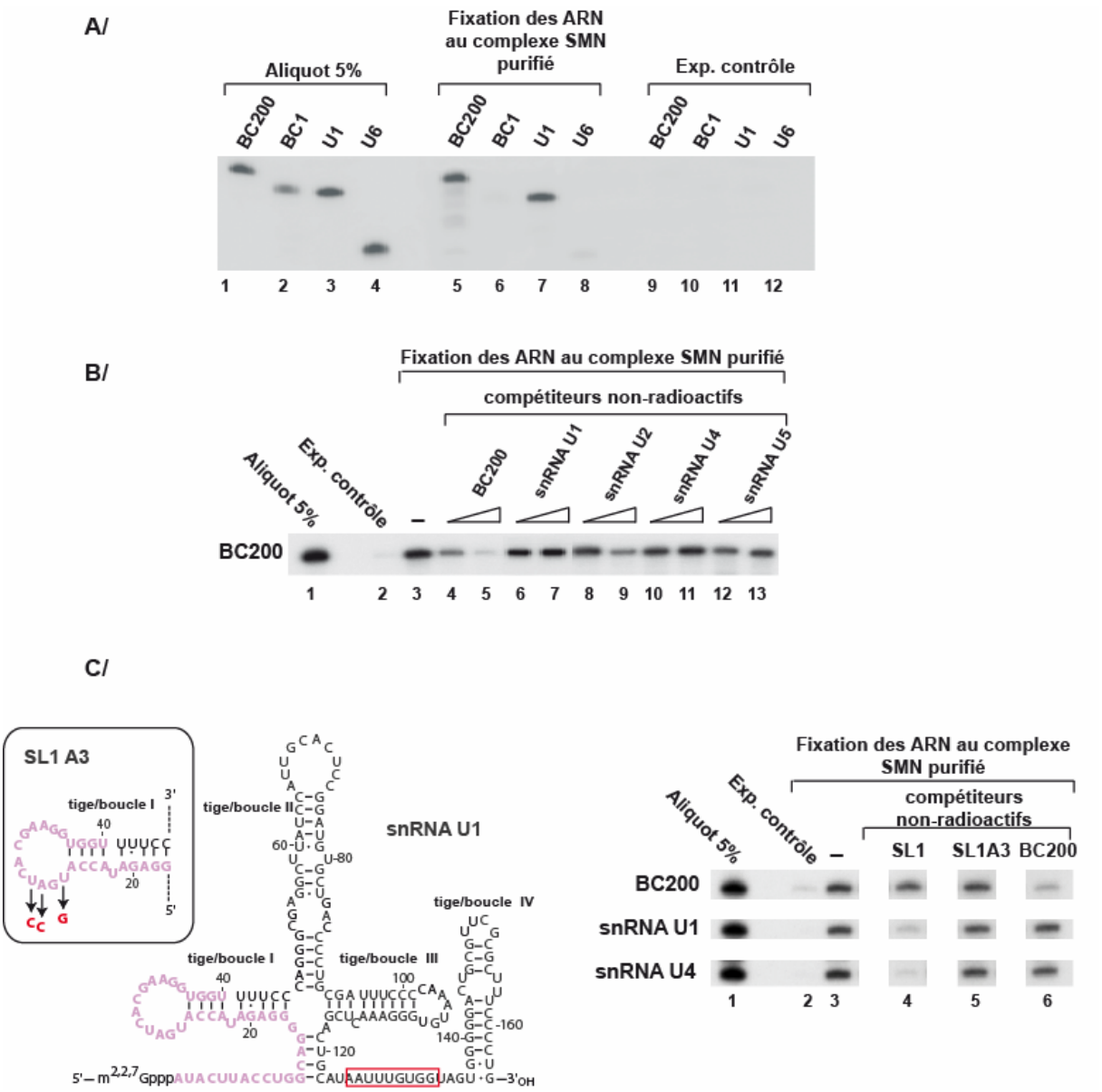


Figure 50 : L'ARN BC200 se fixe au complexe SMN en reconnaissant des éléments au sein du complexe différents de ceux reconnus par les snRNA U1, U4 et U5

A/ Test de l'interaction des ARN U1, U6, BC1 et BC200 produits par transcription *in vitro* avec le complexe SMN purifié dans les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les différents ARN radioactifs ont été incubés en présence du complexe SMN purifié et immobilisé sur billes d'agarose (Fixation des ARN au complexe SMN purifié, pistes 5 à 8) ou en présence des billes d'agarose incubées avec un extrait ne contenant pas la protéine Flag-Gemin2 (Exp. Contrôle, pistes 9 à 12). Après lavage des billes, les ARN fixés au complexe SMN ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 10%. **B/** Le complexe SMN est pré-incubé pendant 30 min. avec les snRNA U1, U2, U4 et U5 et l'ARN BC200 non radioactifs à des concentrations de 50 nM et 250 nM puis incubé 1h. avec l'ARN BC200 radioactif. ***C/*** Le complexe SMN est pré-incubé pendant 30 min. avec la structure tige-boucle 1 du snRNA U1 (SL1), qui renferme le site de fixation au complexe SMN (encart à gauche), avec le mutant SL1A3, qui ne contient plus le site de fixation au complexe SMN (encart à gauche) et l'ARN BC200 non radioactifs à une concentration de 250 nM puis incubé 1h. avec les snRNA U1, U4 et l'ARN BC200 radioactifs. 5% de la quantité d'ARN utilisée pour chaque analyse ont été fractionnés en parallèle des ARN décrochés du complexe SMN (Aliquot).

répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de compétition pour la fixation au complexe SMN de l'ARN BC200 et des UsnRNA. Plus précisément, nous avons comparé le taux d'ARN BC200 fixé au complexe SMN avec ou sans l'ajout, au préalable, d'un excès de UsnRNA ou d'ARN BC200 non radioactifs ***(Figure 50 B/ et C/)***. Le complexe SMN, fixé aux billes d'agarose couplées aux anticorps anti-Flag, a d'abord été incubé pendant 30 min. avec des concentrations croissantes d'ARN non radioactifs (50 nM et 250 nM) correspondant à un excès respectivement de 2500 fois et 12500 fois par rapport à l'ARN radioactif. Après lavages, le complexe SMN a été incubé avec l'ARN radioactif. Comme attendu, la fixation au préalable d'ARN BC200 non radioactifs au complexe SMN purifié limite fortement la fixation de l'ARN BC200 radioactif ***(Figure 50 B/, pistes 4 et 5)***. Au contraire, l'incubation préalable des snRNA U1, U4 et U5 avec le complexe SMN n'empêche pas la fixation de l'ARN BC200 ***(Figure 50 B/, pistes 6, 7 et 10 à 13)***. Par conséquent, l'ARN BC200 ne se fixe, sans doute, pas aux mêmes sites que les snRNA U1, U4 et U5. Ce résultat a été confirmé par des expériences complémentaires réalisées par S. Massenet ***(Figure 50 C/)***. En effet, elle a montré qu'une fixation préalable de l'ARN BC200 non radioactif au complexe SMN bloque la fixation de l'ARN BC200 radioactif mais pas celle des snRNA U1 et U4 ***(Figure 50 C/, piste 6)***. Elle a également montré que la tige-boucle 1 du snRNA U1 (SL1), qui renferme le site de fixation du snRNA U1 au complexe SMN (Yong et al, 2002), inhibe la fixation des snRNA U1 et U4 au complexe SMN, mais pas la fixation de l'ARN BC200 ***(Figure 50 C/, piste 4)***. Au contraire, l'ARN SL1A3 qui porte 3 mutations au niveau de la tige-boucle 1 du snRNA U1 détruisant le site de fixation du snRNA U1 au complexe SMN (Yong et al, 2002) ***(Figure 50 C/, encart à gauche)***, ne bloque pas la fixation ni des snRNA U1 et U4 ni de l'ARN BC200 au complexe SMN ***(Figure 50 C/, piste 5/)***

De manière intéressante, nous avons observé, de façon reproductible, une diminution de la fixation de l'ARN BC200 radioactif au complexe SMN après fixation du snRNA U2 non radioactif ***(Figure 50 B/, pistes 8 et 9)***. Il faut noter que le snRNA U2 est le plus grand des UsnRNA. Aussi nous pouvons formuler deux hypothèses : soit le site de fixation du snRNA U2 est similaire et chevauche celui de l'ARN BC200, soit les deux sites de fixation au sein du complexe SMN sont différents mais du fait de sa grande taille le snRNA U2 gène la fixation de l'ARN BC200.

L'ensemble de ces résultats nous permette de conclure que l'ARN BC200 a la capacité d'interagir, *in vitro*, avec le complexe SMN et que son site de fixation est distinct de celui des UsnRNA U1, U4 et U5.

2/ Etude expérimentale de la structure secondaire de l'ARN BC200 in vitro

Après la mise en évidence d'une interaction entre l'ARN BC200 et le complexe SMN purifié, nous avons décidé de débuter des études afin de définir son domaine d'interaction. Dans ce but, nous avons tout d'abord réalisé une analyse expérimentale de la structure secondaire de cet ARN.

2.1/ Stratégie expérimentale

Comme mentionné en introduction, aucune étude expérimentale de la structure 2D de l'ARN BC200 n'avait été réalisée. Par contre, deux modèles différents de structure 2D ont été proposés. Le premier modèle concerne uniquement la partie 5' de cet ARN qui a pour origine la rétrotransposition d'une séquence Alu, comme c'est le cas pour l'ARN 7S de la particule SRP. La structure 2D de cet ARN avait servi de base pour la réalisation de ce modèle ***(Figure 51 A/)*** (Bovia & Strub, 1996). Le second modèle de structure secondaire avait été proposé par comparaison avec la structure 2D établie expérimentalement pour l'ARN BC1 de souris ***(Figure 51 B/)*** (Rozhdestvensky et al, 2001 ; Zalfa et al, 2003). L'ARN BC1 est issu d'un autre processus de rétrotransposition à partir de l'ARN de transfert alanine ($ARNt^{Ala}$) (pour revue, Brosius, 1999), d'où la divergence de séquence par rapport à l'ARN BC200. Le seul élément commun à ces deux ARN correspond à un long enchaînement de résidus A. D'après ce second modèle, la partie 5' terminale de l'ARN BC200 a une structure différente de celle proposée dans le premier modèle ***(Figure 51 B/)*** (Zalfa et al, 2003). En m'appuyant sur l'expertise du laboratoire en matière d'analyse des structures secondaires des ARN, j'ai étudié expérimentalement celle de l'ARN BC200. Le principe de l'étude consistait à utiliser des sondes chimiques et enzymatiques testant la nature simple ou double brin des nucléotides au sein de l'ARN en solution (cf. partie *Matériels et Méthodes*). Les

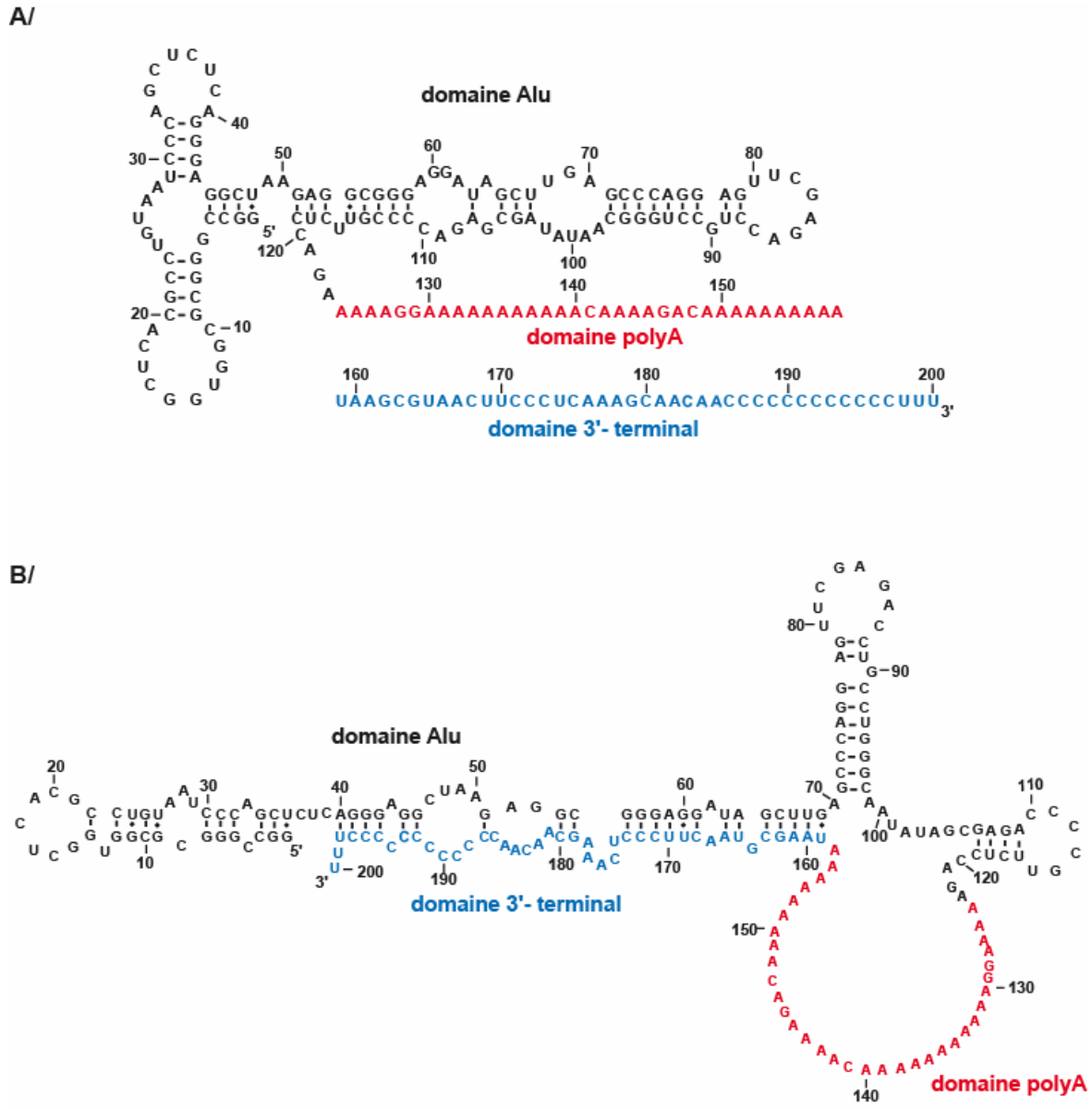


Figure 51 : Modèles de structure secondaire proposés pour l'ARN BC200

A/ Modèle de structure 2D proposé pour la partie 5' de l'ARN BC200 sur la base de la structure établie pour le domaine Alu de l'ARN 7S de la particule SRP (Bovia & Strub, 1996). Le domaine Poly A et le domaine 3' terminal, pour lesquels aucune structure 2D n'avait été proposée par les auteurs, sont représentés de manière linéaire. **B/** Modèle de structure 2D proposé pour l'ARN BC200, sur la base de la structure 2D établie pour l'ARN BC1 de souris (Zalfa et al, 2003). Dans ces deux modèles, le domaine Alu est représenté en noir, le domaine Poly A en rouge et le domaine 3' terminal en bleu.

sondes chimiques utilisées : DMS, CMCT et kéthoxal modifient spécifiquement certaines des positions des nucléotides impliqués dans les interactions Watson-Crick. Les modifications ne peuvent donc avoir lieu que si les résidus ne sont pas impliqués dans une hélice. Trois enzymes ont été utilisées : les RNases V1, T2 et T1. La RNase V1 coupe spécifiquement des régions d'ARN en double brin ou structurées par empilement de bases. Lorsqu'elles sont utilisées en conditions limitantes, les RNases T1 et T2 coupent préférentiellement des régions en simple brin (cf. partie *Matériels et Méthodes,* **Fig. 41**, page 146). L'ensemble du domaine Alu a été analysé par l'emploi de sondes chimiques et enzymatiques. Les positions des modifications ou des coupures ont été identifiées par transcription inverse. Les ADN complémentaires ainsi générés ont été visualisés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Dans le cas de la région 3' terminale, comme l'amorce aurait masqué l'analyse de la séquence, l'ARN BC200 a été marqué à son extrémité 3' par incorporation de pCp [α^{32}-P]. Dans ces conditions, seules des hydrolyses enzymatiques peuvent être réalisées. Les produits des coupures ont été identifiés en réalisant une hydrolyse statistique en conditions alcalines et par chauffage de l'ARN BC200, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Dans ces conditions, des coupures peuvent avoir lieu au niveau de chacune des liaisons phosphodiesters. Il faut alors adapter les conditions pour n'avoir en moyenne qu'une seule coupure par molécule. On obtient alors un ensemble de bandes différant les unes des autres par la présence d'un résidu supplémentaire. Les résidus G ont aussi été identifiés grâce à une hydrolyse par la RNase T1 en conditions dénaturantes. Les produits de coupures obtenus en conditions ménagées, c'est-à-dire dans des conditions préservant la structure 2D de l'ARN, ont été fractionnés directement par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant, en parallèle des produits de l'hydrolyse statistique et par la RNase T1 en conditions dénaturantes.

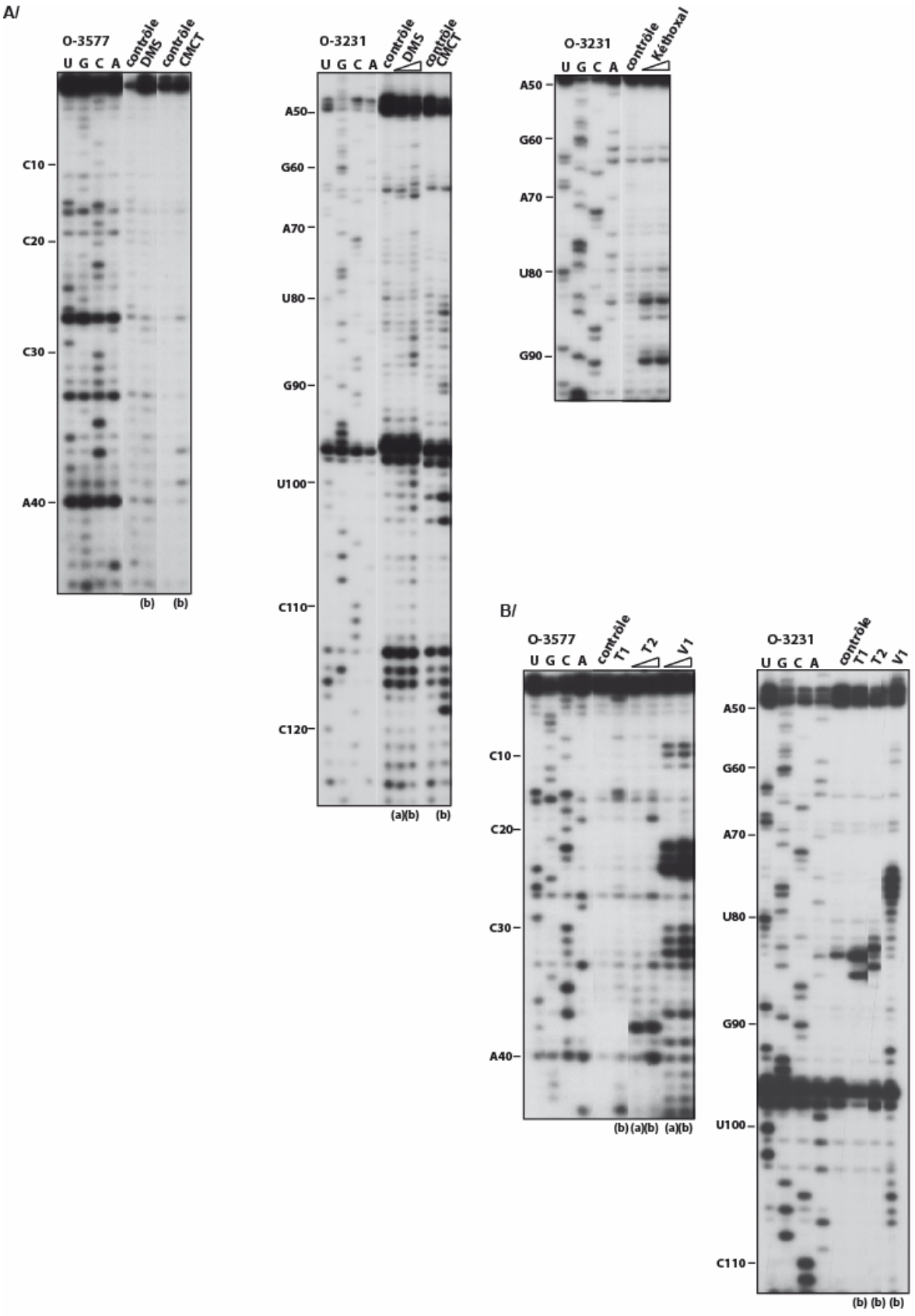
L'ensemble des données expérimentales d'hydrolyses enzymatiques et de modifications chimiques, que nous avons obtenues, ont été définies comme des contraintes pour la recherche d'un modèle de structure secondaire, à l'aide du programme Mfold. Ce programme tient compte de la stabilité thermodynamique des appariement de bases (Jaeger et al, 1989) (disponible à l'adresse suivante : http://mfold.bioinfo.rpi.edu/).

2.2/ Analyse de la structure 2D de la région correspondant aux nt 1 à 120

L'ensemble du domaine Alu de l'ARN BC200 a été analysé par l'emploi de sondes chimiques et enzymatiques. Chaque expérience a été répétée au moins 4 fois. Des exemples de fractionnement sont illustrés sur la ***figure 52***. Parmi les différents modèles proposés par le logiciel Mfold, nous avons retenu celui correspondant à la structure la plus stable tout en étant compatible avec nos données expérimentales. Dans ce modèle, il faut noter que la boucle 1 est très peu accessible à l'action des RNases et des agent chimiques et que, dans la boucle 2, des coupures aux RNases V1 ont été détectées. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'interactions entre les boucles 1 et 2 conduisant à la formation d'une structure de type pseudo-nœud ***(figure 52, C/)***. Une telle structure a déjà été observée dans la région 5' du domaine Alu de l'ARN 7S (nt 1 à 46), dans laquelle les deux boucles sont appariées par appariement de type Watson-Crick ***(Figure 38 B/, page 123)*** (Weichenrieder et al, 2000). Dans la structure 2D que nous proposons pour l'ARN BC200, les 50 nt 5' terminaux adoptent une structure similaire à celle formée par la région correspondante de l'ARN 7S. Cette observation est en accord avec le fait que cette région, commune aux deux ARN, constitue, dans chacun de ces deux ARN, le site de fixation des protéines SRP 9 et SRP 14 (Bovia & Strub, 1996 ; Kremerskothen et al, 1998b).

Dans la ***figure 53*** nous avons comparé la structure 2D, à laquelle nous avons abouti expérimentalement, aux modèles précédemment proposés dans la littérature. Clairement, le modèle proposé sur la base de la structure 2D de l'ARN BC1, que nous appellerons modèle (A) ***(Figure 53 A/)***, est très différent de celui que nous proposons ***(Figure 53 C/)***. En effet, dans ce modèle prédictif (A), seule l'hélice 5 et la boucle 3, que nous proposons, sont retrouvées. Par ailleurs, plusieurs coupures fortes par la RNase V1 sont situées dans des régions peu structurées du modèle et des modifications chimiques fortes sont observées dans des régions proposées être en double brin. Nos données expérimentales ne sont donc pas en faveur d'une structure 2D de l'ARN BC200 similaire à celle de l'ARN BC1.

Le modèle de structure 2D qui a été proposé pour le domaine Alu de l'ARN BC200 à partir de celui de l'ARN 7S ***(Figure 53 B/)***, que nous appellerons modèle (B), est par contre plus proche de notre modèle expérimental ***(Figure 53 C/)***. En effet, non seulement, nous retrouvons, l'hélice 5 et la boucle 3, mais en plus les 50 nt 5' terminaux adoptent des


A/
O-3577
U G C A
contrôle DMS
contrôle CMCT
C10
C20
C30
A40
(b) (b)
O-3231
U G C A
contrôle DMS
contrôle CMCT
A50
G60
A70
U80
G90
U100
C110
C120
(a)(b) (b)
O-3231
U G C A
contrôle Kéthoxal
A50
G60
A70
U80
G90
B/
O-3577
U G C A
contrôle T1 T2 V1
C10
C20
C30
A40
(b) (a)(b) (a)(b)
O-3231
U G C A
contrôle T1 T2 V1
A50
G60
A70
U80
G90
U100
C110
(b) (b) (b)

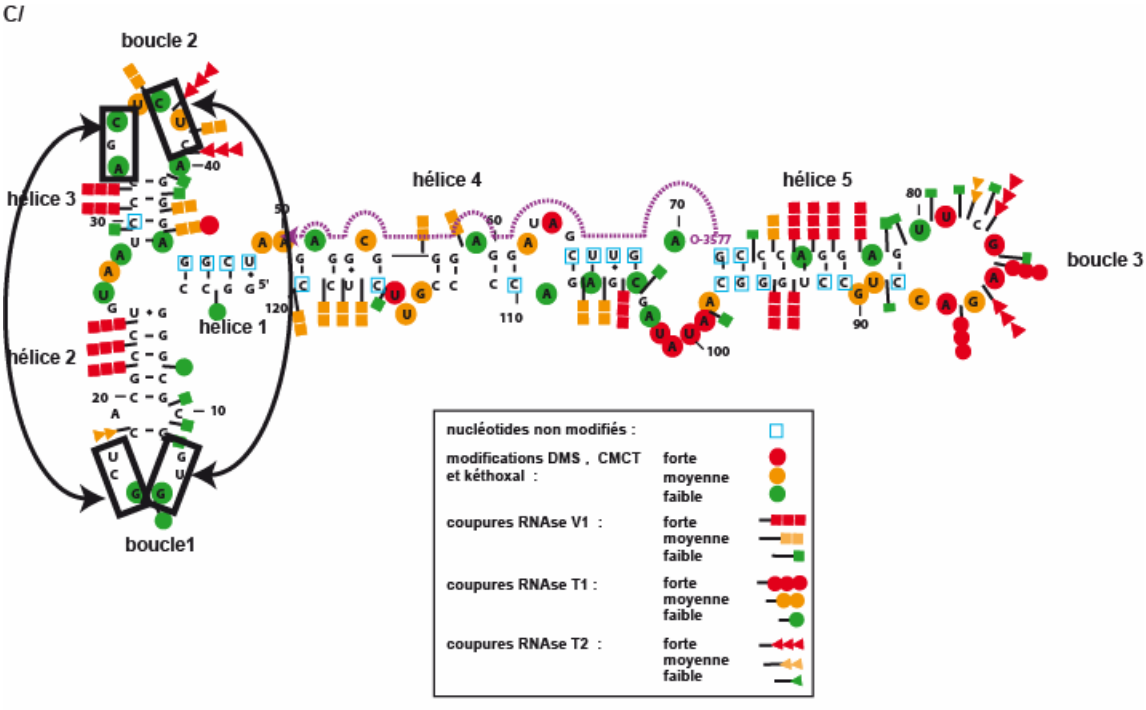


Figure 52 : Analyse expérimentale de la structure 2D du domaine Alu de l'ARN BC200 (positions 1 à 120 de l'ARN BC200)

A/ et B/ Le transcrit BC200 a été soumis à des modifications chimiques ménagées, en ajoutant deux concentrations de kéthoxal (1,8 µg/µl (a) et 4,6 µg/µl (b)), de DMS (0,25 µl (a) et 0,5 µl (b)) et de CMCT (8,4 µg/ µl (a) et 21 µg/µl (b)) (panneau A), et à des coupures enzymatiques en conditions limitantes en ajoutant deux concentrations de RNases T1 (1 et 2 U), T2 (1 et 2 U) et V1 (0,02 et 0,04 U) (panneau B). Les conditions de réaction sont décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les pistes «contrôle» correspondent à des incubations sans agent chimique ou sans enzyme. Les positions des modifications ont été analysées par des extensions d'amorces par la transcriptase inverse. L'oligonucléotide utilisé est indiqué en haut des autoradiographies (panneaux A et B). Les arrêts d'extension ont été identifiés grâce à un séquençage du transcrit réalisé avec le même oligonucléotide (pistes U, G, C et A). Les ADN complémentaires résultant de l'extension d'amorces ont été fractionnés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant à 7%. ***C/*** Représentation schématique des données obtenues sur le modèle de structure 2D proposé pour le domaine Alu. Les bases impliquées dans l'établissement du pseudo-nœud sont également indiquées. Le mode de représentation des données est indiqué dans l'encart à droite. L'oligonucléotide 3577 ayant servi d'amorce est également indiqué et l'oligonucléotide 3231 n'est pas représenté car il s'hybride aux positions 148 à 132 de l'ARN BC200 qui ne sont pas visibles sur cette représentation.

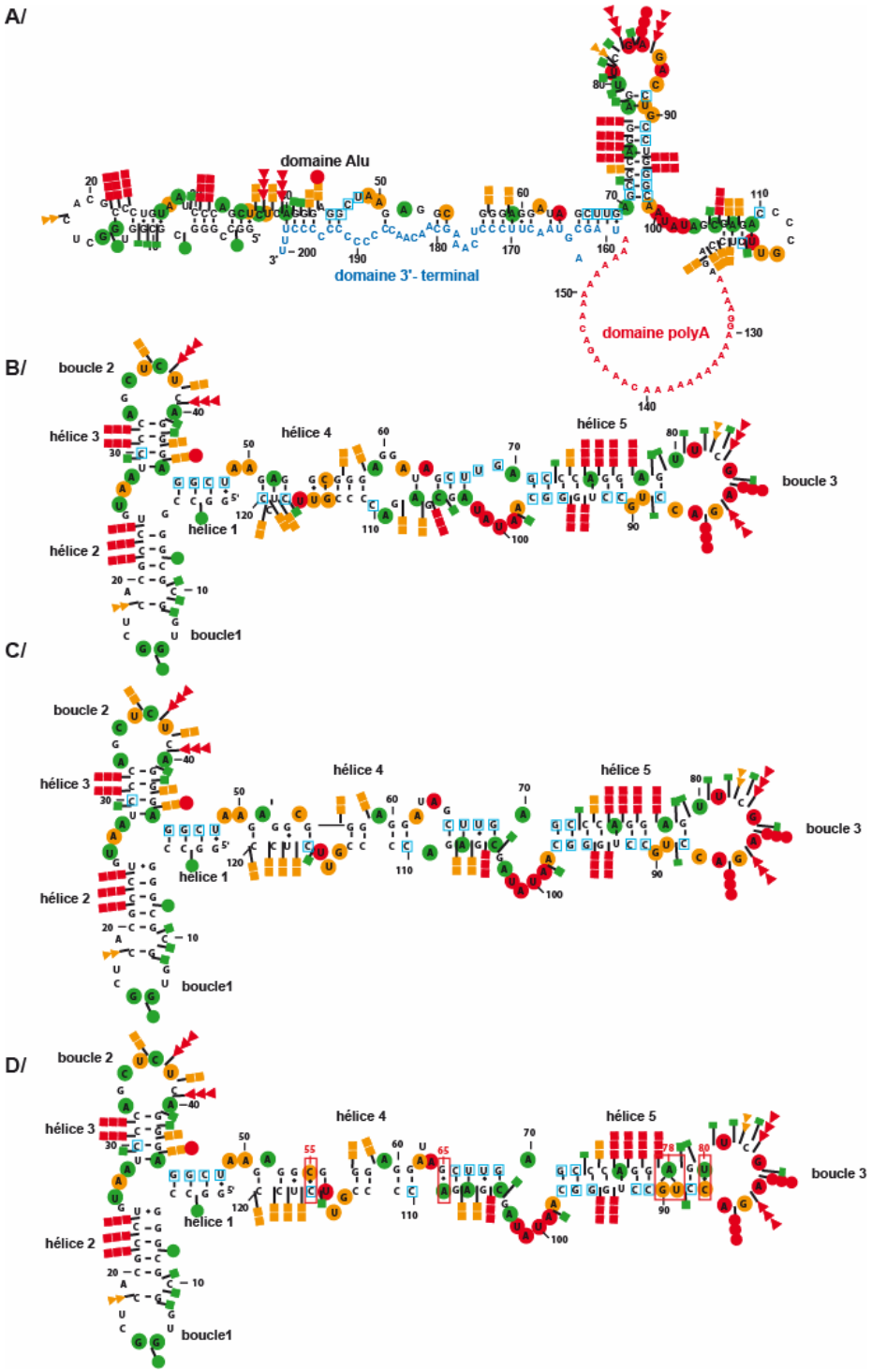


Figure 53 : Représentation schématique de nos données expérimentales sur les différents modèles proposés pour l'ARN BC200

A/ Modèle de structure 2D proposé pour la partie 5' de l'ARN BC200 sur la base de la structure établie pour le domaine Alu de l'ARN 7S de la particule SRP (Bovia & Strub, 1996) **B/** Modèle de structure 2D proposé sur la base de la structure 2D établie pour l'ARN BC1 de souris (Zalfa et al, 2003) **C/** Modèle de structure 2D auquel nous avons abouti sur la base de nos données expérimentales **D/** Modèle de structure secondaire du domaine Alu (nt 45 à 120) proposé d'après une étude réalisée par N. Loecker *(communication personnelle)*. Les différences d'appariements de bases aux positions 55, 65, 78 et 80 sont encadrées en rouge.

repliements identiques. Ainsi, nos résultats expérimentaux valident la structure proposée dans le modèle (B) pour les segments allant respectivement des positions 1 à 50 et 70 à 100. Par contre, la structure que nous proposons pour l'hélice 4 diffère à plusieurs positions par rapport à celle proposée dans le modèle prédictif (B). En effet, la structure proposée dans le modèle prédictif (B) ne permet pas d'expliquer l'ensemble des modifications et des clivages que nous avons obtenus pour les segments correspondant aux positions 50 à 70 et 100 à 120 ***(Figure 53 B/)***. Pour cette partie du domaine Alu, nos données ne confirment donc pas le modèle (B).

N. Locker a réalisé, au cours de son stage post-doctoral dans l'équipe de PJ. Lukavsky (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Angleterre), une analyse par RMN de la structure 2D du domaine Alu (positions 1 à 120 de l'ARN BC200). N. Locker nous a communiqué ses données dans le but de les comparer à celles que nous avons obtenues par l'emploi de sondes chimiques et enzymatiques. Comme on peut le voir sur la ***figure 53 D/***, les résultats de RMN corroborent notre modèle de structure 2D. Par l'analyse RMN, N. Locker a pu identifier en plus des interactions de type Watson-Crick des interactions non canoniques. N. Locker propose, en effet, l'existence d'une paire de bases non canonique C_{55}•C_{117} ***(Figure 53 D/)***. L'empilement des 4 paires de bases obtenu en tenant compte de la paire C_{55}•C_{117}, est en meilleur accord avec les 4 clivages par la RNase V1 que la structure avec le C_{55} en boucle latérale. La faible modification du résidu C_{55} par le DMS peut s'expliquer par le fait que la paire C_{55}•C_{117} ne correspond pas à une interaction de type Watson-Crick. N. Locker a aussi proposé une seconde paire de bases non canonique G_{65}•A_{109} ***(Figure 53 D/)***. En accord avec la formation de cette paire de bases non canonique, ces deux résidus sont peu accessibles aux agent chimiques et enzymatiques dans nos expériences. De plus, N. Locker a mis en évidence une interaction triple G_{90}-A_{78}-U_{89} au sein de l'hélice 5 et la formation d'une paire U_{80}•C_{87}, prolongeant cette hélice ***(Figure 53 D/)***. A nouveau, la faible accessibilité des résidus A_{78}, U_{89}, U_{80}, C_{87} et G_{90} et la présence de coupures par la RNase V1 observées dans cette partie de l'hélice 5 sont en accord avec l'existence de ces interactions non canoniques.

Nos expériences et celles de N. Locker non publiées confirment, donc, que la région 5' de l'ARN BC200 adopte un repliement très similaire à celui de l'ARN 7S.

L'ensemble des données permet d'aboutir à un modèle de structure 2D pour le domaine Alu vérifié par deux types d'approches.

2.3/ Analyse de la structure 2D de la région 3' terminale

Les sondes chimiques et enzymatiques, citées ci-dessus ont aussi été employées pour analyser la région allant des positions 121 à 200. Ces expériences ont été répétées plusieurs fois et les résultats obtenus ont été reproductibles. Un exemple de fractionnement, illustré dans la ***figure 54 panneaux A à C***, montre, comme attendu, que la région poly A est en simple brin. En effet, elle est très accessible à la RNase T2 et totalement modifiée par le DMS. *In vivo*, ce domaine riche en A est recouvert par la protéine PABP (*PolyA Binding Protein*), qui doit stabiliser et protéger cette longue région simple brin. (Muddashetty et al, 2002). Comme mentionné ci-dessus, pour analyser la région 3' terminale (positions 179 à 200) nous avons dû réaliser un marquage en 3' de l'ARN BC200 et dans ce cas seules des hydrolyses enzymatiques ont été réalisées et les produits des coupures ont été identifiés en réalisant une hydrolyse statistique en conditions alcalines et une RNase T1 en conditions dénaturantes de l'ARN BC200. De manière inattendue, la région 3' terminale est clivée par la RNase V1. D'une manière générale, la région 3' semble fortement structurée. Or seules deux courtes hélices peuvent être formées : l'une interne à la région 3' et l'autre mettant en jeu une séquence en amont de la région poly A. Le niveau élevé de coupures par la RNase V1 dans le segment riche en résidus C (nt 180 à 200) ne peut pas s'expliquer par des appariements de type Watson-Crick. La présence de ces coupures suggère, donc, une structure particulière de cette région riche en résidus C.

Nous en concluons donc que la région du poly A est bien en simple brin et que la région 3' terminale à une forte structure de nature inconnue.

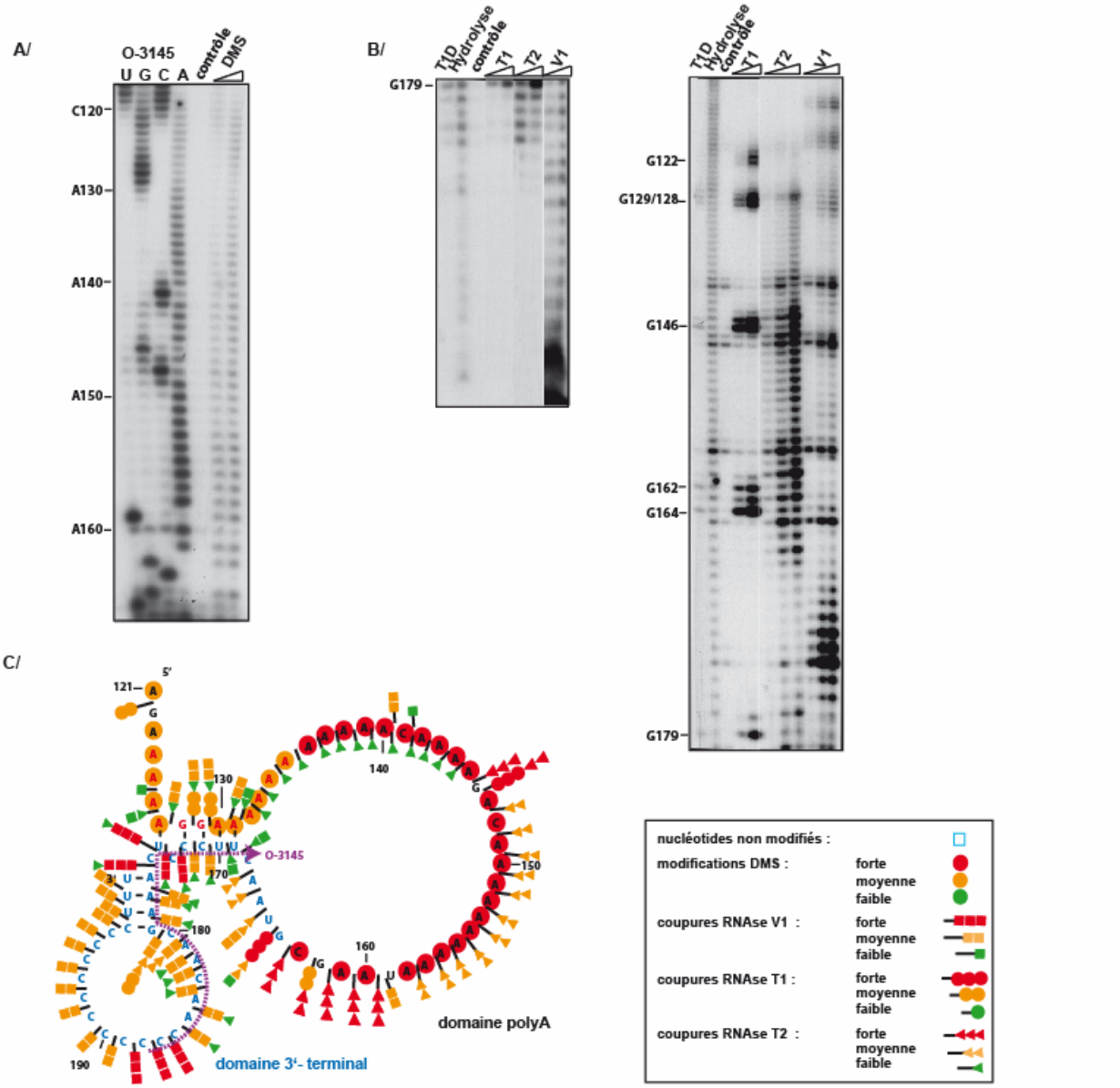


Figure 54 : Analyse expérimentale de la structure 2D de l'extrémité 3' de l'ARN BC200

A/ et B/ Le transcrit BC200 a été soumis à des modifications chimiques, en ajoutant deux quantités de DMS (0,25 µl et 0,5 µl) (panneau A), ou à des coupures enzymatiques en conditions limitantes en ajoutant deux concentrations de RNases T1 (1 à 2 U), T2 (1 à 2 U) et V1 (0,02 à 0,04 U) (panneau B). Les conditions de réaction sont décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les pistes «contrôle» correspondent à des incubations sans agent chimique ou sans enzyme. Les positions des modifications ont été analysées par une extension d'amorce par la transcriptase inverse. L' oligodésoxynucléotide utilisé est indiqué en haut de l'autoradioagraphie (panneau A). Les arrêts d'extension ont été identifiés grâce à un séquençage du transcrit réalisé avec le même oligodésoxynucléotide (pistes U, G, C et A). Les ADNc résultant de l'extension d'amorce ont été fractionnés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant à 7%. Les positions des nucléotides au sein de la séquence de l'ARN BC200 sont indiquées à gauche des autoradiographies. Dans le panneau B, le transcrit BC200 a été marqué radioactivement à son extrémité 3'-terminale, par incorporation de pCp [α^{32}-P]. Les positions des coupures enzymatiques ont été identifiées grâce à une hydrolyse alcaline statistique (piste hydrolyse) et à des coupures par la RNase T1 du transcrit en conditions dénaturantes (piste T1D). ***C/*** Représentation schématique des données obtenues sur le modèle de structure 2D proposé pour la région allant des positions 121 à 200. Le mode de représentation des données est indiqué dans l'encart à droite. L'oligodésoxynucléotide 3145 ayant servi d'amorce est également indiqué.

3/ Recherche des domaines de l'ARN BC200 requis pour son interaction avec le complexe SMN in vitro

3.1/ Analyse des capacités d'interaction des mutants de l'ARN BC200 avec le complexe SMN purifié

Sur la base de la structure 2D de l'ARN BC200, à laquelle nous avions abouti, nous pouvions étudier la contribution de chacune des régions de cet ARN dans la mise en place de l'interaction avec le complexe SMN. Dans ce but, plusieurs constructions ont été réalisées afin de produire des ARN BC200 tronqués par transcription *in vitro* ***(Figure 55)***. L'étude de l'interaction de ces ARN avec le complexe SMN purifié a été réalisée comme décrit précédemment.

Etant donné que le domaine Alu constitue un élément structural bien défini, l'un des fragments testé a été l'ARN BC200N120, correspondant à ce domaine Alu. Logiquement, il aurait fallu tester l'efficacité de fixation du domaine 3'. Malheureusement, le taux de production de ce fragment d'ARN par transcription *in vitro* était trop faible, pour que nous puissions réaliser un test de fixation. Nous avons donc produit cet ARN sous deux formes différentes: (i) fusionné à la partie 5' du domaine Alu (ARN BC200Δ51-125), la séquence située entre les positions 51 et 125 est éliminée dans cet ARN, et (ii) en association avec le domaine Alu incluant les résidus 60 à 120 (BC200ΔAlu5'), où la région 5' terminale de l'ARN qui pourrait former une structure en pseudo-nœud est absente. Enfin, afin de tester l'importance de la région poly A, elle a été éliminée dans l'ARN BC200Δ133-165. Les résultats, présentés sur la ***figure 56***, montrent clairement que le domaine Alu seul n'interagit pas avec le complexe SMN purifié (ARN BC200N120) ***(Figure 56, piste 12)***. Une faible interaction a été observée avec l'ARN BC200, dans lequel, seuls les 50 nt 5' terminaux avaient été éliminés (ARN BC200ΔAlu5'). La meilleure fixation a été obtenue pour l'ARN BC200Δ133-165, où seul le domaine poly A a été éliminé. Nous en concluons que la séquence du poly A n'est pas importante pour l'interaction avec le complexe SMN. Nous constatons que seuls des ARN contenant le domaine 3' terminal sont capables d'interagir avec le complexe SMN (ARN BC200ΔAlu5' et ARN BC200Δ133-165). Ces deux ARN comportent, aussi, la partie 3' du domaine Alu (nt 50 à 120).

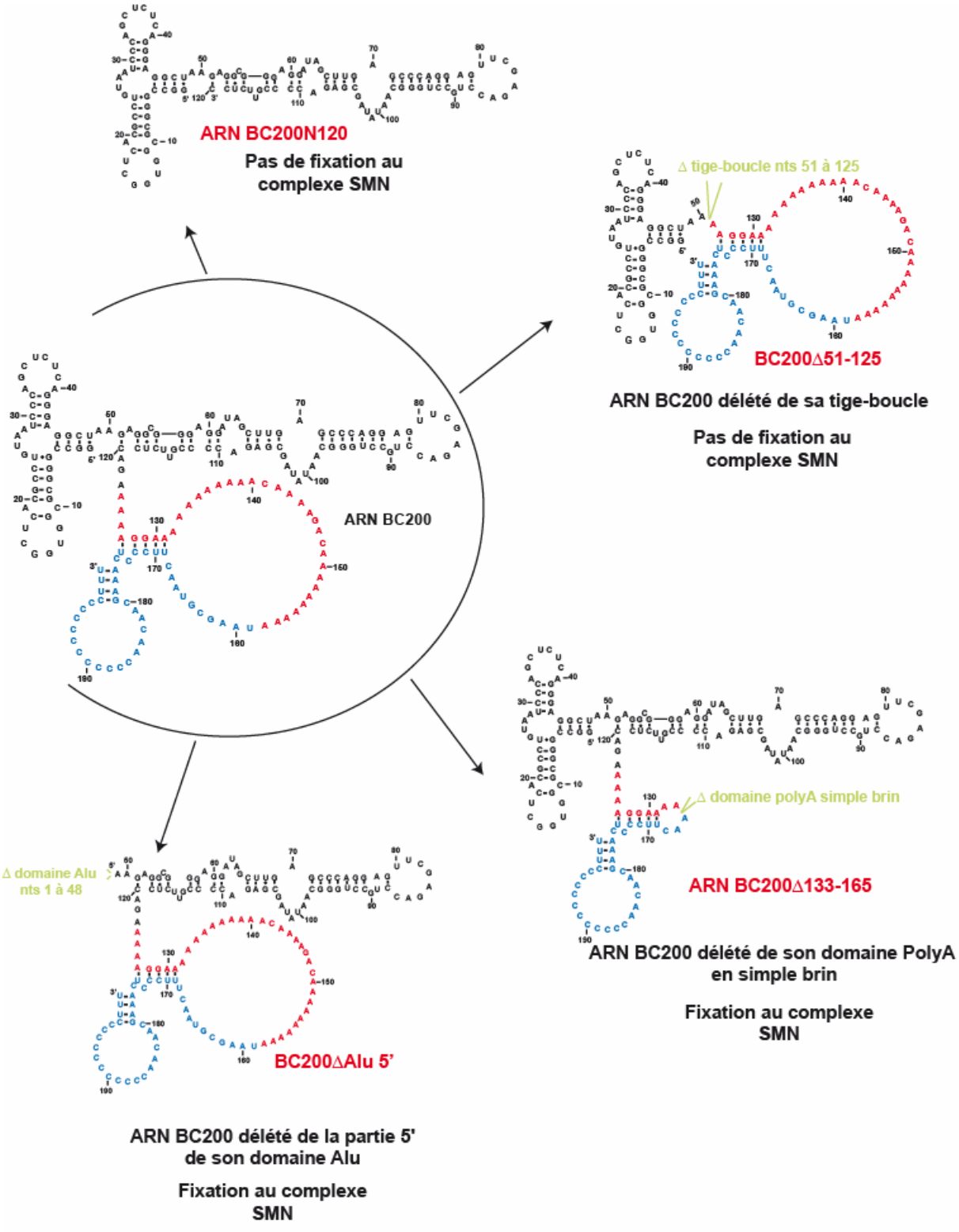


Figure 55 : L'ARN BC200 sauvage et les mutants que nous avons produits

La structure secondaire proposée pour chacun des ARN tronqués produits est basée sur le modèle de structure 2D que nous proposons pour l'ARN BC200 (Figure 53). La capacité des mutants à fixer le complexe SMN est également indiquée.

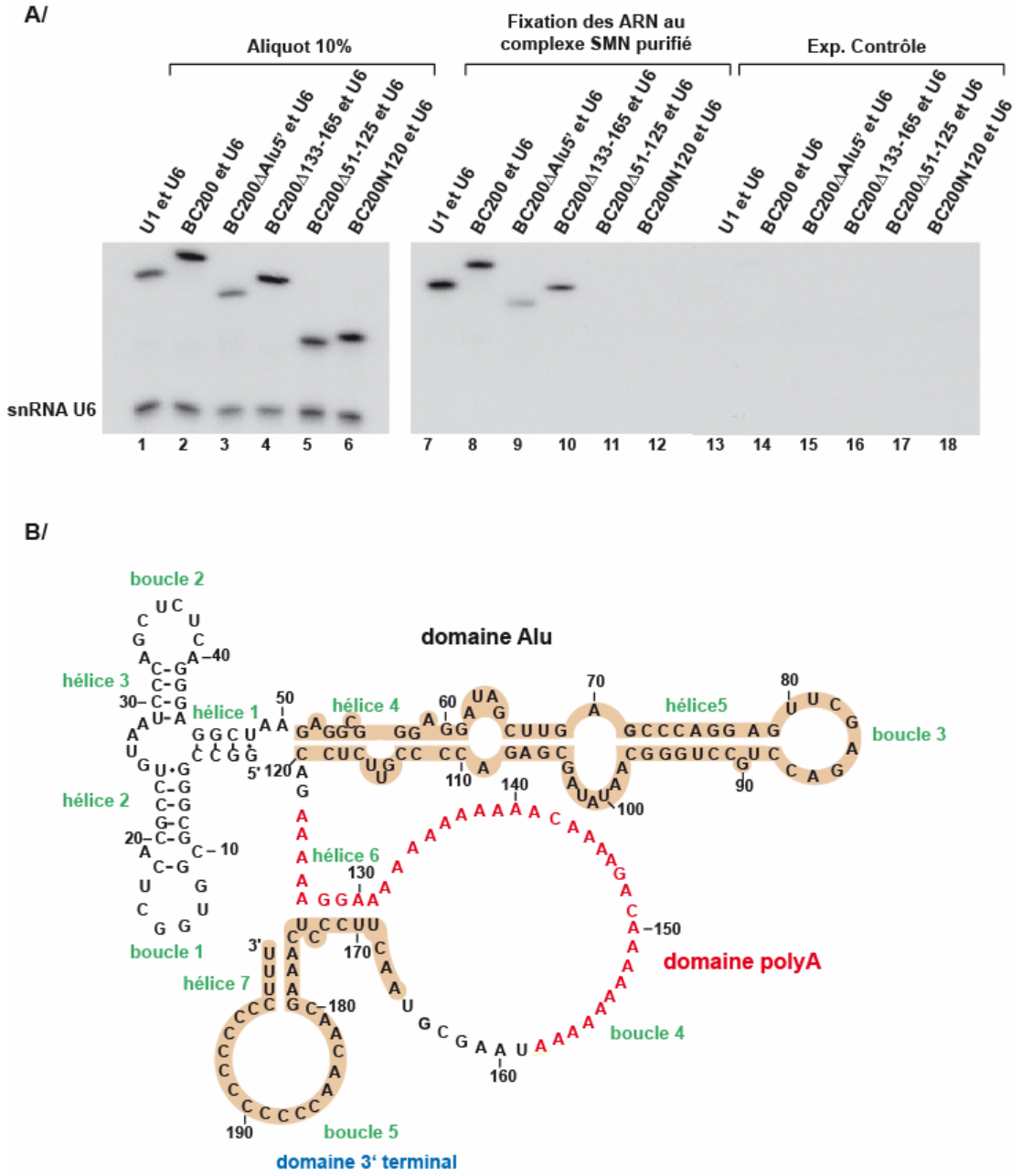


Figure 56 : Identification des domaines de l'ARN BC200 permettant sa fixation au complexe SMN purifié

A/ Test d'interaction des ARN BC200 sauvage et mutants produits par transcription *in vitro* avec le complexe SMN purifié dans les conditions décrites dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les différents ARN sont incubés en présence du complexe SMN purifié, immobilisé sur billes d'agarose (Fixation des ARN au complexe SMN purifié, pistes 7 à 12) ou en présence des billes d'agarose incubées avec un extrait ne contenant pas la protéine Flag-Gemin2 (Exp. Contrôle, pistes 13 à 18). Après lavage des billes, les ARN fixés au complexe SMN ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Les snRNA U1 et U6 ont servi respectivement de contrôles positif et négatif. 10% de la quantité d'ARN utilisée pour chaque analyse ont été fractionnés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant en parallèle des ARN décrochés du complexe SMN (Aliquot, pistes 1 à 6). **B/** Les domaines de l'ARN BC200, indiqués sur un fond de couleur interviennent dans l'établissement d'une interaction avec le complexe SMN purifié.

En conclusion, les 40 nt 3' terminaux de l'ARN BC200, qui adoptent d'après nos données une structuration forte et non canonique pourraient jouer un rôle important dans la mise en place de l'interaction avec le complexe SMN purifié. Par ailleurs, la partie du domaine Alu allant des positions 51 à 120 pourrait renforcer l'interaction soit en interagissant aussi avec le complexe SMN soit en favorisant le repliement du domaine 3'.

3.2/ Identification de la région de l'ARN BC200 protégée par le complexe SMN

Ayant mis au point des conditions d'hydrolyse ménagée de l'ARN BC200 pour analyser sa structure secondaire, j'ai utilisé ces mêmes conditions pour identifier par la technique d'empreinte, la région protégée par le complexe SMN au sein des macro-complexes ARN BC200/complexe SMN. L'ARN BC200, marqué à son extrémité 3', a été d'abord incubé avec le complexe SMN purifié, comme décrit précédemment. Les ARN fixés au complexe ont ensuite été soumis à l'action des RNases T1, A et V1, comme décrit ci-dessus et dans la partie *Matériels et Méthodes*. Dans ces conditions, seuls les nucléotides en simple brin ou accessibles dans le complexe étaient clivés par les RNases. Le fractionnement par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant des produits d'hydrolyse obtenus nous a permis de détecter les régions de l'ARN BC200 masquées par le complexe SMN. Nous avons constaté de fortes diminutions des clivages par la RNase V1 des positions 168 à 200 ***(Figure 57)***. Deux interprétations sont possibles : soit la fixation du complexe SMN détruit la structure particulière formée par la région 3', soit les nucléotides 168 à 200 sont protégés par le complexe SMN et interagissent directement avec le complexe SMN purifié. Cette dernière hypothèse serait en accord avec nos précédentes données. Néanmoins, les deux hypothèses ne sont pas complètement exclusives l'une de l'autre. En effet, en plus de la forte diminution des clivages par la RNase V1, dans la région 3' terminale, nous observons un renforcement des hydrolyses par les RNases T1 et A des segment situés entre les positions 122 et 164. On pourrait donc imaginer que le complexe SMN se lie au segment 3' terminal (nt 168 à 200) et que de ce fait l'ensemble de la structure du domaine 3' soit dépliée ou du moins qu'une partie

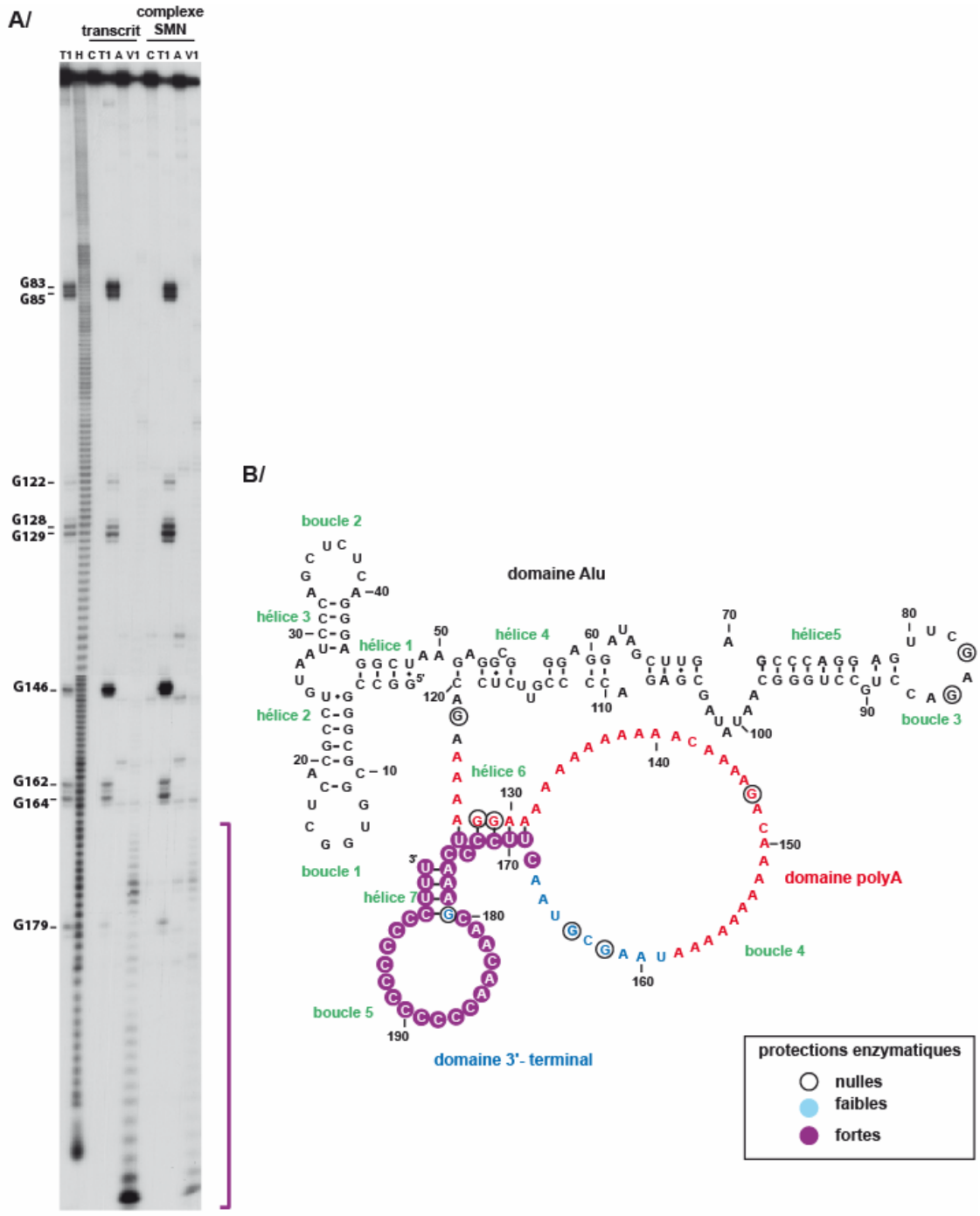


Figure 57 : Identification de la région de l'ARN BC200 protégée contre l'action des RNases au sein du macro-complexe ARN BC200/complexe SMN

A/ L'ARN BC200, marqué à son extrémité 3', a été incubé avec le complexe SMN purifié. L'ARN nu (pistes transcrit) et les ARN fixés au complexe (pistes complexe SMN) ont ensuite été soumis à l'action des RNases T1, A et V1, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les ARN clivés ont ensuite été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Les positions des coupures enzymatiques ont été identifiées grâce à une hydrolyse alcaline statistique (piste H) et à une hydrolyse par la RNase T1 en conditions dénaturantes (piste T1), comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les positions des nucléotides G dans la séquence de l'ARN BC200 sont indiquées à gauche de l'autoradiographie. **B/** Représentation schématique sur le modèle de structure secondaire de l'ARN BC200 que nous avons établi de la région protégée de l'action des RNases au sein du macro-complexe ARN BC200/complexe SMN.

soit déstabilisée. Par ailleurs, la fixation au complexe SMN du domaine 3' (nt 168 à 200) est en accord avec les résultats que S. Massenet a obtenus par l'emploi de la technique d'hydrolyse alcaline précédemment utilisée par l'équipe de G. Dreyfuss pour délimiter les domaines des UsnRNA nécessaires à leur interaction avec le complexe SMN (Yong et al, 2004a) ***(Figure 58)***. Cette technique permet, en effet, de déterminer grossièrement les régions impliquées dans une interaction. Ainsi, S. Massenet a d'abord soumis l'ARN BC200, marqué à son extrémité 3', à une hydrolyse alcaline ménagée, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les ARN hydrolysés ont ensuite été incubés avec le complexe SMN purifié. Les ARN fixés au complexe ont ensuite été analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Dans ces conditions, seuls les ARN hydrolysés contenant la région d'interaction avec le complexe SMN seront visibles.

L'ensemble des résultats, obtenus par 3 approches différentes, montre l'importance de l'intégrité du domaine 3' terminal de l'ARN BC200 (nt 168 à 200) pour qu'il y ait mise en place d'une interaction avec le complexe SMN.

3.3/ Recherche d'une interaction entre le complexe SMN et l'ARN BC200 in cellulo

Ayant montré la capacité l'ARN BC200 à interagir, *in vitro,* avec le complexe SMN purifié, il était important d'essayer de mettre en évidence l'existence d'une telle interaction dans un extrait cellulaire. L'ARN BC200 est spécifiquement exprimé dans les neurones humains, c'est pourquoi, les analyses ont été réalisées à partir d'une lignée cellulaire de neuroblastomes humains SH-SY5Y (n° ATCC : CRL-2266) que nous avions utilisée pour montrer une interaction entre le complexe SMN et la protéine FMRP (Piazzon et al, 2008). La stratégie choisie était d'immunosélectionner le complexe SMN grâce à un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine SMN (anticorps 2B1) et immobilisé sur des billes de G-séphorose. Nous espérions ainsi tester la co-immunosélection de l'ARN BC200 en utilisant, soit la technique de Northern-Blot, soit une amplification par la technique PCR après transcription inverse.

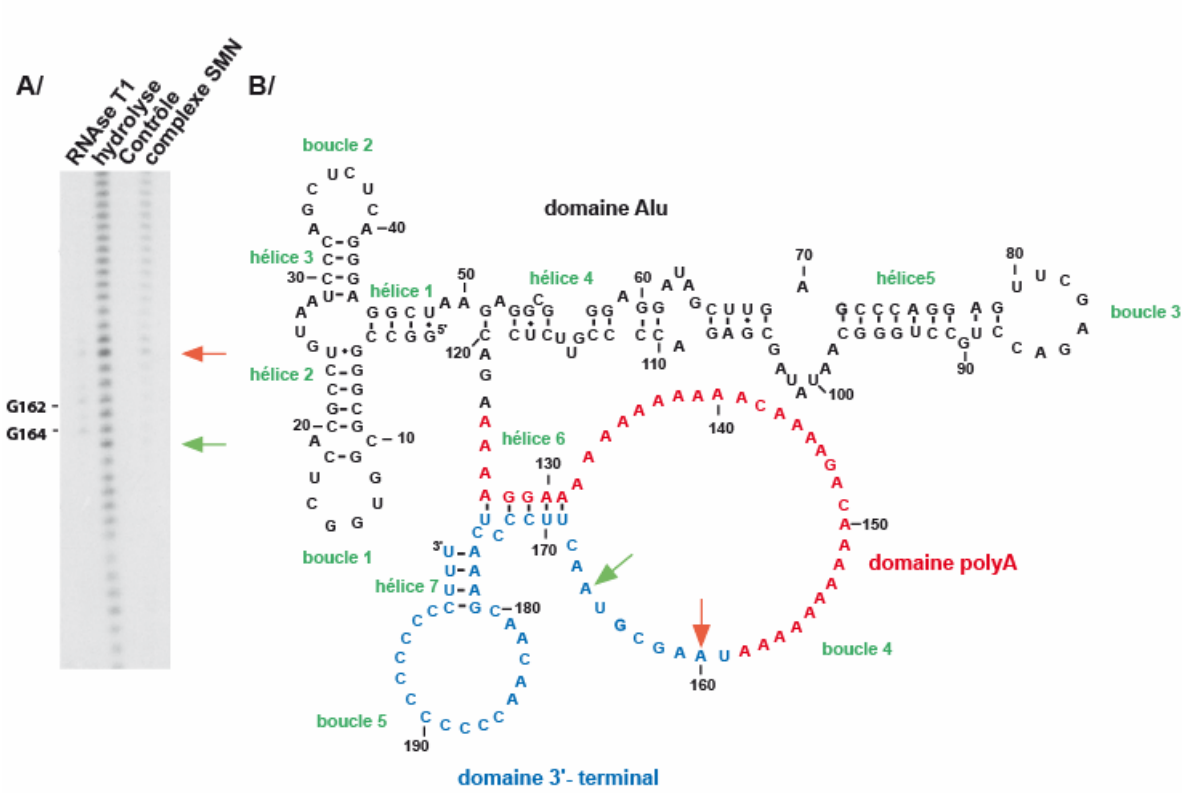


Figure 58 : Identification des domaines de fixation de l'ARN BC200 au complexe SMN par hydrolyse alcaline

A/ Analyse des domaines de fixation de l'ARN BC200 au complexe SMN par hydrolyse alcaline ménagée. L'ARN BC200, marqué à son extrémité 3', a été soumis à une hydrolyse alcaline ménagée, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les ARN hydrolysés ou non (piste contrôle) ont ensuite été incubés avec le complexe SMN purifié (piste complexe SMN). Les ARN fixés au complexe ont ensuite été analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant. Les positions des nucléotides ont été identifiées grâce à une hydrolyse ménagée (piste hydrolyse) et à des coupures par la RNase T1 du transcrit en conditions dénaturantes (piste RNase T1). Les positions des nucléotides G au sein de la séquence de l'ARN BC200 sont indiquées à gauche de l'autoradiographie. **B/** Représentation schématique sur le modèle de structure secondaire de l'ARN BC200 que nous avons établi des domaines de fixation de l'ARN BC200 au complexe SMN.

La technique de Northern-Blot ne s'est pas avérée suffisamment sensible pour ce type d'étude. En effet, alors que les snRNA U1, U2, U4 et U5 interagissent avec le complexe SMN, nos expériences n'ont révélé que l'interaction du snRNA U1 avec ce complexe. L'ARN BC200 n'a pas non plus été détecté. Nous avons alors testé la présence de l'ARN BC200 au sein du complexe SMN immunosélectionné, par RT-PCR, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Des couples d'oligonucléotides spécifiques de l'ARN BC200 et des snRNA U1 (contrôle positif) et U6 (contrôle négatif) ont été sélectionnés (cf. partie *Matériels et Méthodes,* **Tableau IX**). L'amplification des ADN complémentaires aux transcrits des snRNA U1, U6 et de l'ARN BC200 ***(Figure 59, pistes 1 à 3)*** et des ARN contenus dans l'extrait cellulaire ***(Figure 59, pistes 4 à 6)*** a été réalisée en tant que contrôle. Les conditions d'amplification paraissant satisfaisantes, nous avons alors réalisé l'expérience d'immunosélection du complexe SMN avec l'anticorps 2B1 immobilisé sur des billes de G-sépharose (IS 2B1) et une expérience contrôle avec des billes de G-sépharose auxquelles est fixé un anticorps contrôle (IS SP2/O) ***(Figure 59, pistes 7 à 12)***. Après lavages des billes et traitement par la protéinase K, pour détruire les interactions protéiques, les ARN retenus sur les billes sont extraits au phénol et soumis à des expériences de RT-PCR. Nous avons, malheureusement, obtenus des taux d'amplification similaires pour l'essai et pour l'expérience contrôle (IS SP2/O). De plus, le snRNA U6 est détecté dans l'immunosélection dirigée contre la protéine SMN (IS 2B1), alors que cet ARN ne se fixe pas au complexe SMN. Autrement dit, dans nos conditions, les ARN fixés non spécifiquement sont amplifiés autant que les ARN fixés spécifiquement. La diminution du nombre de cycles de PCR ne nous a pas permis de résoudre ce problème. Nous n'avons donc pas apporter d'argument en faveur d'une interaction du complexe SMN avec l'ARN BC200 dans un extrait de cellules neuronales, par ces deux approches.

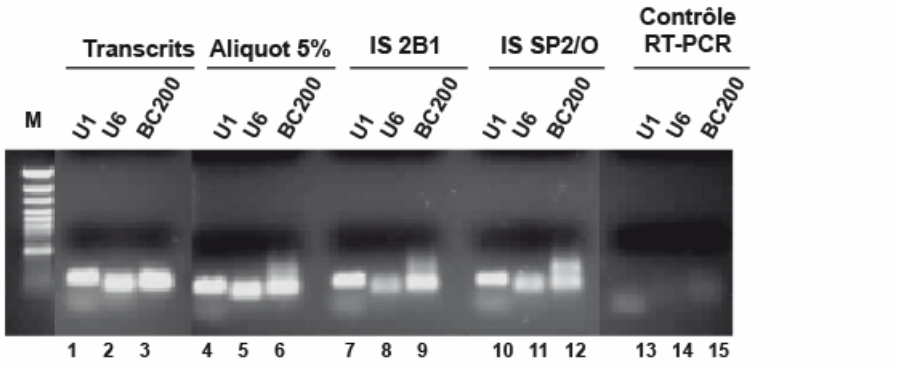


Figure 59 : Recherche par RT-PCR d'une interaction entre l'ARN BC200 et le complexe SMN dans des extraits de cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y)

Des extraits totaux de cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y) ont été préparés pour immunsélectionner le complexe SMN grâce à un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine SMN (IS 2B1, pistes 7 à 9) ou d'un anticorps contrôle immobilisée sur des billes de G-sépharose (IS SP2/O, pistes 10 à 12). La co-immunosélection de l'ARN BC200 et du snRNA U1, utilisé comme témoin positif, a ensuite été testée par RT-PCR, à l'aide d'oligonucléotides spécifiques à chaque ARN testé, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Le snRNA U6 a également été testé en tant que contrôle négatif. 5% de la quantité d'extraits utilisés pour chaque analyse a également été soumis à une RT-PCR et les ADNc obtenus ont été fractionnés par électrophorèse en gel d'agarose 1% (Aliquot, pistes 4 à 6). Des RT-PCR ont été réalisées sur des transcrits produits *in vitro* (Transcrit, pistes 1 à 3) et sur les ARN totaux extraits des cellules sans avoir été soumis à une transcription inverse (Contrôle RT-PCR, pistes 13 à 15). Ce dernier contrôle permet d'estimer d'éventuelles contaminations d'ADN génomique. M correspond au marqueur de taille.

III/ Conclusions et perspectives

1/ La structure secondaire de l'ARN BC200 et ses domaines d'interaction avec le complexe SMN

La structure 2D que nous avons proposée pour l'ARN BC200 comporte deux domaines distincts : le domaine Alu (nt 1 à 120) et le domaine 3' (nt 121 à 200) contenant la séquence Poly A (nt 121 à 158). La partie 3' terminale allant des positions 159 à 200 est spécifique à l'ARN BC200 ***(Figure 54, page 215)***. Elle n'est retrouvée ni dans l'ARN 7S de la particule SRP, ni dans l'ARN BC1. Pour compléter nos données, il sera important d'analyser la structure 2D de chacun de ces domaines en les produisant de manière individuelle, dans le but de s'assurer qu'elle est identique à celle observée dans l'ARN BC200 entier. Ces analyses apporteront une confirmation du modèle et peut-être des informations sur le type de structuration particulière de la région 3'.

Ces études sont d'autant plus importantes, que la recherche de la ou des région(s) de l'ARN BC200 nécessaire(s) à son interaction avec le complexe SMN a montré que la partie 3' terminale de l'ARN BC200 (excepté la séquence poly A) allant des positions 168 à 200 est nécessaire à cette fixation. En effet, sa délétion conduit à une absence de fixation de l'ARN BC200 au complexe SMN ***(Figure 56, page 218)***. Nous avons observé un changement très important de son accessibilité à la RNase V1 lorsque l'ARN BC200 est fixé au complexe SMN ***(Figure 57, page 220)***. Enfin, les expériences basées sur l'hydrolyse alcaline de l'ARN BC200 ont révélé que le segment allant des positions 168 à 200 de l'ARN BC200 est suffisant pour qu'il y ait fixation au complexe SMN ***(Figure 58, page 222)***. Par ailleurs, la région de l'ARN BC200 comprise entre les positions 51 et 125 peut, soit interagir aussi avec le complexe SMN, soit jouer un rôle dans la structuration globale de l'ARN. L'analyse de la structure secondaire de l'ARN mutant BC200Δ51-125, dans lequel ce segment est éliminé, devrait apporter des informations sur l'importance de la structure tige-boucle (nt 51-120) pour la stabilité globale de la structure de l'ARN BC200 et en particulier sur le domaine 3' de l'ARN.

D'une manière générale, il sera intéressant d'étudier quel peut être le type de structuration particulière adoptée par la région 3' terminale de l'ARN BC200. C'est pourquoi il sera nécessaire de définir quel est le domaine minimal requis pour que cette structure particulière se forme. Il pourra alors être intéressant d'approfondir son étude par l'emploi de différent agent chimiques modifiant non seulement les positions Watson-Crick mais aussi les positions N-7 des guanines et des adénines qui pourraient intervenir dans des interactions de type non Watson-Crick.

Jusqu'à présent, aucune structure de type tétrade similaire aux tétrades de guanines n'a été proposée pour les séquences riches en résidus C. Seules des structures de type « i motif » et des triples hélices ont été présentées. Cependant, elles nécessitent pour leur stabilité une protonation d'une partie des résidus C et de ce fait elles sont peu stables à pH physiologique.

L'approche la plus informative serait d'analyser la structure tridimensionnelle de cette région soit par RMN soit par radiocristallographie. Comme nous avons des difficultés à la produire par transcription *in vitro*, nous devrons donc envisager sa synthèse chimique.

Lorsque nous aurons obtenu un minimum d'information sur la structuration de cette région, nous pourrons alors envisager la réalisation d'expériences d'interférence de modification afin de définir plus précisément la zone de contact avec le complexe SMN. Bien sûr, il sera aussi intéressant d'essayer d'identifier quelle(s) protéine(s) du complexe SMN interagit avec l'ARN BC200 comme nous le décrirons plus loin.

2/ Les UsnRNA et l'ARN BC200 n'ont pas le même mode de fixation au complexe SMN

L'étude des interactions entre les UsnRNA ou de mini-substrats dérivés des UsnRNA avec le complexe SMN a permis à l'équipe de G. Dreyfuss de proposer que deux types de motifs ARN sont capables de se fixer au complexe ***(Figure 60)*** :

• la tige-boucle 1 du snRNA U1

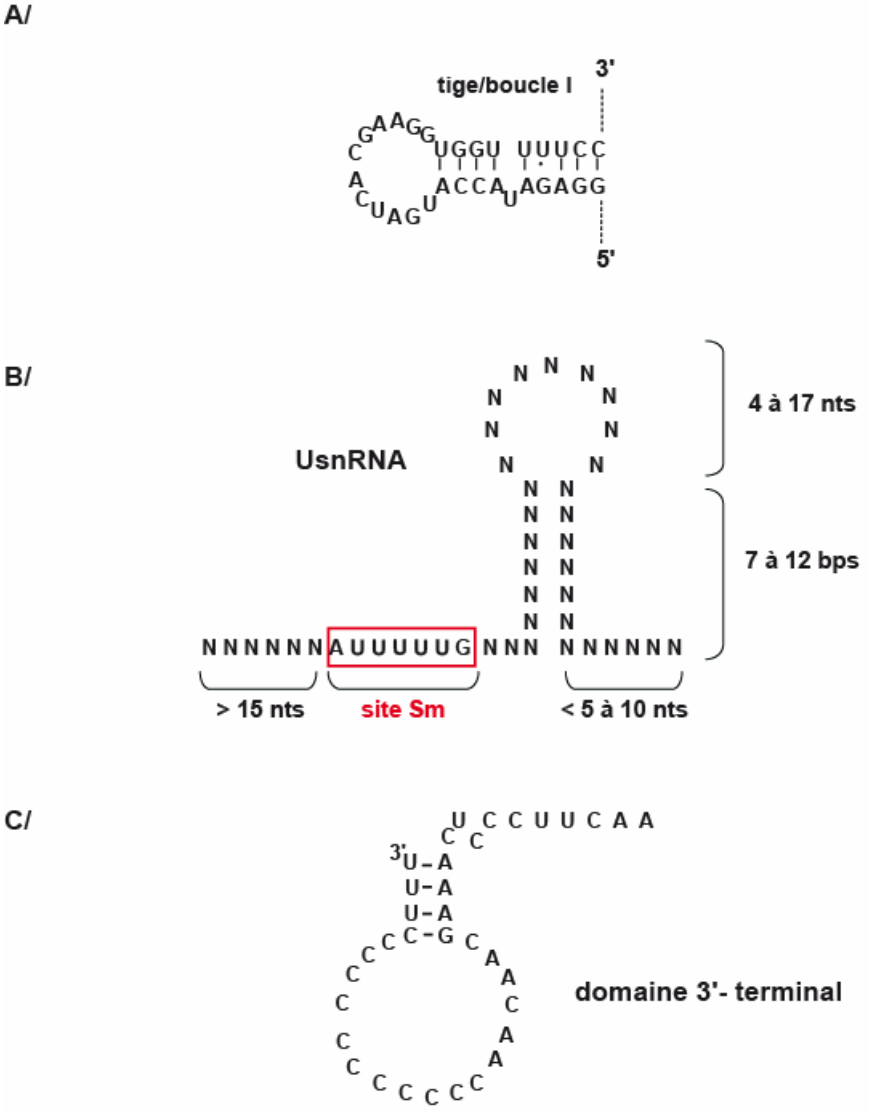


Figure 60 : Représentation schématique des 3 motifs ARN se fixant au complexe SMN

A/ Motif identifié au sein du snRNA U1 (Yong et al, 2002). ***B/*** Région minimale commune aux UsnRNA (Branlant et al, 1982) et permettant la fixation au complexe SMN. Cette région est constituée de la séquence Sm et d'une structure en tige-boucle en aval (Yong et al, 2002 ; Yong et al, 2004a ; Golembe et al, 2005b). ***C/*** Motif identifié au sein de l'ARN BC200.

• les segment des snRNA U2, U4 et U5 contenant le site Sm (motif commun initialement mis en évidence par notre équipe, (Branlant et al, 1982) et une structure en tige-boucle située en aval.

Ces deux motifs ARN sont supposés interagir avec des sites différents au sein du complexe SMN. Comme décrit en introduction, l'équipe de G. Dreyfuss a proposé que la protéine Gemin 5 soit la protéine du complexe SMN capable de fixer spécifiquement les UsnRNA (Battle et al, 2006). Cette protéine doit donc comporter des sites de fixation différents pour chacun de ces motifs. La question est de savoir si la protéine Gemin 5 est le seul facteur de reconnaissance au sein du complexe SMN. L'identification de la ou des protéine(s) au sein du complexe SMN capable de fixer l'ARN BC200 parait donc essentielle. Différentes approches peuvent être envisagées : le pontage covalent aux UV de l'ARN BC200 radioactif au complexe SMN, suivi de son hydrolyse et de l'identification de la ou des protéine(s) portant des nucléotides radioactifs. Une seconde approche peut être l'emploi de la technique triple hybride pour tester l'interaction possible du domaine 3' de l'ARN BC200 avec chacune des protéines du complexe SMN. Un résultat ne sera obtenu que si la protéine interagissant au sein du complexe est capable d'interagir à l'état individuel. Une approche complémentaire consistera à produire chacune des protéines du complexe SMN sous forme fusionnée à la protéine GST et immobilisées sur des billes de sépharose couplées au glutathion pour tester leur interaction avec l'ARN BC200 ou son domaine 3' terminal.

3/ Quel pourrait être le lien possible entre l'ARN BC200 et le complexe SMN ?

3.1/ Existe-t-il un lien biologique entre l'ARN BC200 et le complexe SMN ?

Nous n'avons pas réussi à montrer que l'interaction que nous avons mise en évidence *in vitro*, existe *in cellulo* par les techniques de Northern-Blot et de RT-PCR. Néanmoins, il faut mentionner que les mêmes difficultés ont été rencontrées par les autres équipes pour la mise en évidence de l'interaction du complexe SMN avec les UsnRNA. Seule la méthode d'injection de UsnRNA radiomarqués dans les oocytes de *X. laevis* a permis

d'apporter la démonstration de cette interaction *in vivo* (Fischer et al, 1997 ; Yong et al, 2004a ; Yong et al, 2002). L'ARN BC200 étant spécifiquement exprimés dans les neurones, la validité des résultats qui seraient obtenus par cette approche pourrait être questionnée.

Nous pourrons essayer de répéter les tests basés sur la recherche des ARN co-immunosélectionnés avec le complexe SMN en utilisant la technique de RT-PCR quantitative, qui est maintenant implantée au laboratoire. Même si nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre le complexe SMN humain et l'ARN BC1, *in vitro*, il n'est pas exclu que celui-ci puisse interagit avec le complexe SMN murin *in cellulo*. Si les expériences de RT-PCR quantitative s'avèrent concluantes pour l'ARN BC200, nous pourrons essayer d'appliquer cette méthode pour tester l'interaction de l'ARN BC1, l'homologue fonctionnel de l'ARN BC200, avec le complexe SMN murin. Dans ce cas les extraits seront préparés à l'aide de cellules issues d'une lignée de motoneurones de rat (MN1).

Une autre approche permettant de valider les données que nous avons obtenues *in vitro* sera de rechercher une éventuelle co-localisation de l'ARN BC200 avec le complexe SMN dans des neuroblastomes humains (SH-SY5Y). Comme mentionné dans le chapitre précèdent, nous avons établi dans le cadre de l'étude de l'interaction entre la protéine FMRP et le complexe SMN, une collaboration avec F. Rage qui réalise des études d'imagerie cellulaire sur des neurones primaires d'hypothalamus de rat en culture. Nous envisageons d'étudier dans ces neurones, la co-localisation (i) de l'ARN BC1 endogène avec le complexe SMN et (ii) de l'ARN BC200, exprimé par transfection transitoire, avec le complexe SMN. Des constructions permettant de produire par transcription, *in vitro*, en présence d'uridine Cy-3 (excitation : λ = 550 nm et émission λ_{max} = 570 nm), des ARN anti-sens s'hybridant spécifiquement aux régions 3' terminales des ARN BC1 et BC200 ont déjà été réalisées ***(Figure 61)***. La détection d'une co-localisation, *in cellulo*, entre le complexe SMN et l'ARN BC200 permettrait d'initier ensuite des études fonctionnelles.

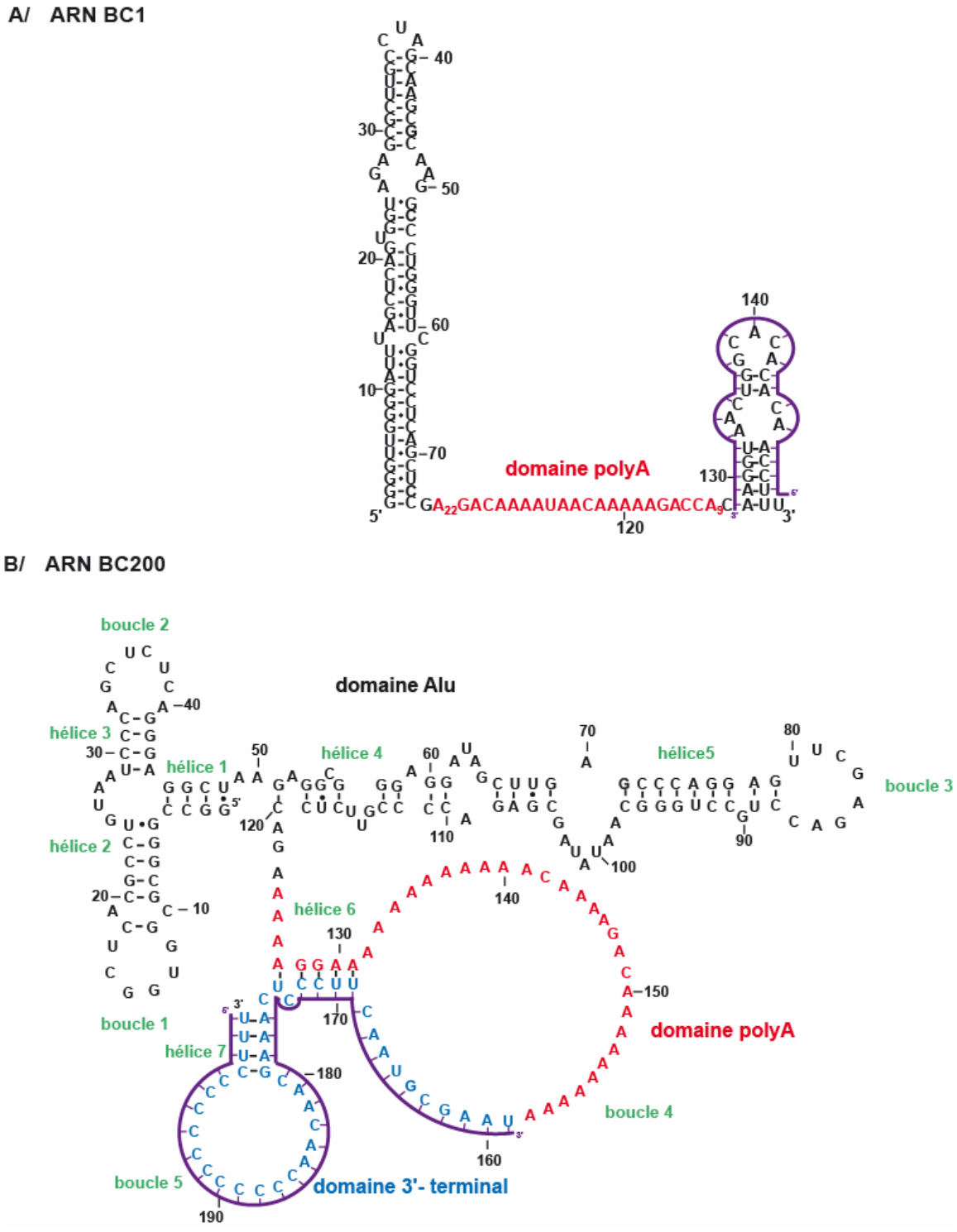


Figure 61 : Sondes prévues pour les tests de localisation des ARN BC1 et BC200 *in cellulo*

Représentation schématique des régions d'hybridation des sondes ARN anti-sens, indiquées en violet, sur la structure secondaire des ARN BC1 et BC200. La structure secondaire de l'ARN BC1 a été établie par (Rozhdestvensky et al, 2001) et celle de l'ARN BC200 correspond au modèle que nous avons établi expérimentalement.

3.2/ Rôle possible du complexe SMN dans l'assemblage de la RNP BC200

Une explication possible de l'interaction que nous avons mise en évidence, *in vitro*, entre l'ARN BC200 et le complexe SMN pourrait être que le complexe SMN intervienne dans l'assemblage de la RNP BC200. Comme décrit en introduction, plusieurs protéines interagissent avec l'ARN BC200, en particulier les protéines SRP 9 et 14, qui s'associe au domaine 5' terminal de l'ARN BC200 (Bovia et al, 1997 ; Kremerskothen et al, 1998b ; Khanam et al, 2006). Néanmoins, certaines des autres protéines identifiées, comme les protéines FMRP, PABP, SYNCRIP, etc ..., pourraient s'associer de manière transitoire à l'ARN BC200. Il serait donc intéressant de purifier cette RNP BC200 afin d'analyser sa composition en protéines. Plusieurs approches peuvent être envisagées.

L'ARN BC200 pourrait être hybridé à un oligonucléotide biotinylé et couplé à la streptavidine. Son incubation avec un extrait cellulaire de neuroblastomes humains (SH-SY5Y) permettrait de retenir les protéines capables de se fixer à cet ARN. Néanmoins, on sait que même en réalisant des lavages dans des conditions stringentes pour éliminer les protéines fixées de manière non spécifiques, cette approche souffre d'un problème important de bruit de fond lié à la fixation forte et non spécifique des protéines aux billes ou aux ARN.

Une autre possibilité pourrait être de produire une lignée exprimant de manière stable l'ARN BC200 avec une séquence additionnelle en 5' ou en 3' de type site de fixation de la protéine de l'enveloppe du phage MS2. Il faudrait alors s'assurer bien sûr que cet ARN puisse former une RNP dans les cellules. Cette RNP pourrait ensuite être purifiée par l'emploi de la protéine de fusion MS2-MBP contenant le domaine de fixation à l'ARN de la protéine de l'enveloppe du phage MS2. Ce domaine lie la séquence MS2 et la protéine MBP (*Maltose Binding Protein*) à des billes d'amylose. Tous ces outils sont disponibles au laboratoire. Le contenu en protéines de la RNP purifiée serait alors analysé par spectrométrie de masse en collaboration avec l'équipe d'A. Van Dorsselear.

Une approche similaire peut être envisagée en créant une lignée cellulaire exprimant de manière stable une des deux protéines se liant au domaine 5' de l'ARN BC200, SRP 9 ou SRP 14, avec une étiquette de type Tap-Tag. A la fois la particule SRP et la RNP BC200 seront purifiées par cette approche. On peut néanmoins espérer éliminer la particule SRP en utilisant un anticorps dirigé contre l'une ou l'autre de ces protéines.

Dans la mesure où l'extinction de la protéine SMN par ARN interférence est fonctionnelle, il sera aussi possible d'utiliser cette approche pour tester l'effet produit sur l'assemblage de la RNP BC200.

3.3/ Rôle possible du complexe SMN dans la fonction de la RNP BC200

Comme décrit en introduction, plusieurs données indiquent que l'ARN BC200, comme son homologue BC1 de souris, pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'initiation de la traduction (Wang et al, 2002 ; Wang et al, 2005 ; Kondrashov et al, 2005 ; Lin et al, 2008). Les interactions que nous avons mises en évidence entre le complexe SMN et deux facteurs de régulation de la traduction dans les neurones : la protéine FMRP et l'ARN BC200, nous permettent de formuler l'hypothèse d'un rôle possible du complexe SMN dans la régulation de la traduction. Cette hypothèse a, d'ailleurs, déjà été mentionnée dans le premier chapitre de la partie « *Résultats-Perspectives* ».

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'équipe de C. Bagni a décrit une interaction entre la protéine FMRP et les ARN BC1 et BC200. Cette équipe a proposé un modèle dans lequel les ARN BC1 et BC200 recruteraient les ARNm cibles de la protéine FMRP par appariements de bases, ce qui assureraient la spécificité du mécanisme de répression de la synthèse protéique ***(Figure 36, page 118)*** (Zalfa et al, 2003). Comme nous l'avons déjà précisé, ce modèle est actuellement réfuté par d'autres équipes qui contestent l'existence de l'interaction observée entre l'ARN BC1 et la protéine FMRP. Ces auteurs proposent que l'ARN BC1 inhibe la traduction de certains ARNm dans les neurones indépendamment de FMRP (Wang et al, 2005 ; Iacoangeli et al, 2008). Néanmoins, l'interaction observée entre l'ARN BC200 et la protéine FMRP n'a pas été remise en cause. C'est pourquoi, il serait tout d'abord important de vérifier la validité de l'interaction observée par Zalfa et al. entre l'ARN BC200 avec la protéine FMRP (Zalfa et al, 2003 ; Zalfa et al, 2005). Si cette interaction est vérifiée, nous envisagerons l'étude d'un lien fonctionnel entre le complexe SMN, l'ARN BC200 et la protéine FMRP.

B/ Mise en évidence et caractérisation de la mise en place d'une interaction entre l'ARN BC200 et la protéine hnRNP-A2

I/ Intérêt de l'étude

Comme déjà mentionné, l'équipe de Tiedge a identifié une région de l'ARN BC1 qui s'associe avec la protéine hnRNP-A2 et qui est nécessaire à son transport à longue distance dans les dendrites (Muslimov et al, 2006). Ces expériences étant réalisées avec des extraits de cerveaux de rats, les auteurs n'apportent donc pas la preuve d'une interaction directe. La protéine hnRNP-A2 est connue pour être impliquée dans le transport de l'ARNm de la protéine MBP (*Myelin Basic Protein*) dans les oligodendrocytes et dans le transport de l'ARNm de la protéine MAP2 dans les neurones (Ainger et al, 1997 ; Hoek et al, 1998 ; Munro et al, 1999 ; Shan et al, 2003). Récemment, il a été montré qu'elle interviendrait dans le transport d'autres ARNm dans les dendrites (pour revue, Carson & Barbarese, 2005). On peut donc imaginer que la protéine hnRNP-A2 joue un rôle dans le transport de l'ARN BC1, ainsi que dans celui de l'ARN BC200 dans les dendrites. Avant tout, il était nécessaire de savoir si la protéine hnRNP-A2 pouvait aussi interagir avec l'ARN BC200 *in vitro*. Ayant démontré que c'était le cas, nous avons ensuite essayé de définir la ou les régions de l'ARN BC200 nécessaire(s) à cette interaction.

II/ Résultats obtenus

1/ Mise en évidence des capacités d'interaction de l'ARN BC200 avec la protéine hnRNP-A2 in vitro

Au laboratoire, un ADNc codant la protéine hnRNP-A2 avait été cloné par J.M. Saliou dans un plasmide d'expression ceci afin de la produire sous forme de fusion avec

la protéine GST. Le séquençage de cet ADNc a, néanmoins, révélé l'existence d'une délétion des résidus 600 à 690 qui codent les aa 200 à 230. Cette délétion concerne le domaine riche en glycines de la protéine et pas les domaines RRM, impliqués dans la fixation aux ARN. Aussi, nous avons décidé de l'utiliser. Nous avons produit cette protéine chez *E. coli*. Les conditions de culture et de purification de la protéine sont détaillées dans la partie *Matériels et Méthodes*. La protéine recombinante de fusion GST-hnRNP-A2 a d'abord été purifiée sur des billes de sépharose couplées à du glutathion puis clivée par la thrombine (5 U, Novagen) pendant une nuit à température ambiante. Les capacités d'interaction de la protéine recombinante avec l'ARN BC200 ont ensuite été testées par des expériences de retard sur gel.

L'ARN BC1 produit sous forme radioactive par transcription *in vitro* interagissait bien avec la protéine hnRNP-A2 recombinante, contrairement au snRNA U1, utilisé comme contrôle négatif ***(Figure 62, pistes 2, 3, 8 et 9)***. Ces résultats montraient que la délétion présente dans notre clone n'altérait pas les propriétés de liaison de la protéine aux ARN. Ces résultats montraient également que la protéine hnRNP-A2 se lie à l'ARN BC200 ***(Figure 62, pistes 5 et 6)***. Ces mêmes expériences de retard sur gel avaient été répétées avec deux concentrations différentes en protéine hnRNP-A2 et montraient la présence de complexes de tailles différentes en fonction de la concentration en protéine hnRNP-A2 utilisée. Ces complexes sont indiqués par des étoiles sur les autoradiographies de la ***figure 62*** et suggéraient que soit la protéine hnRNP-A2 s'oligomérise en se fixant sur un seul site de l'ARN, soit l'ARN possède plusieurs sites de fixation pour la protéine hnRNP-A2. Nous avons fait la même observation pour l'ARN BC1 ***(Figure 62, piste 3)***. L'équipe de Tiedge n'observait qu'un seul complexe mais, comme nous l'avons mentionné, ci-dessus, leur expérience étant réalisée avec un extrait de cerveau de rat, le complexe pourrait contenir plusieurs protéines (Muslimov et al, 2006).

2/ Recherche du ou des site(s) de reconnaissance de la protéine hnRNP-A2 sur l'ARN BC200

L'équipe de Tiegde a proposé que le site de reconnaissance de la protéine hnRNP-A2 sur l'ARN BC1 corresponde à une boucle interne, contenant des paires de bases non-canoniques ***(Figure 34, page 111)*** (Muslimov et al, 2006). D'après le modèle de

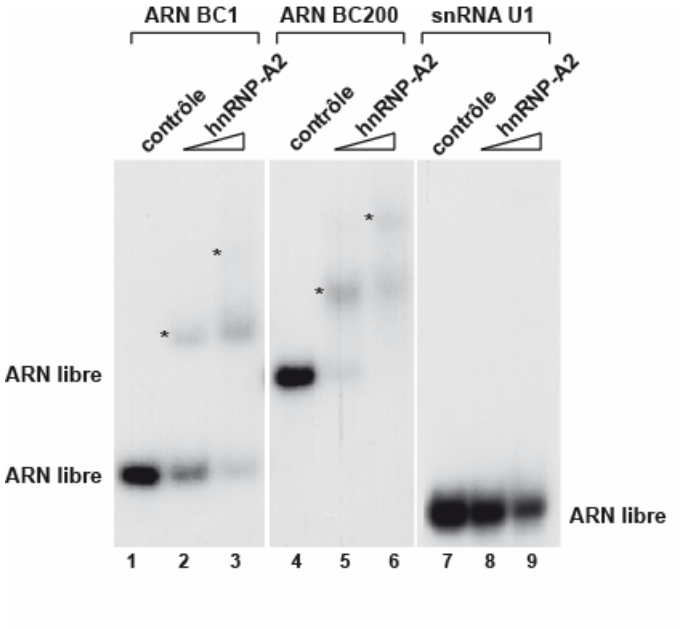


Figure 62 : La protéine hnRNP-A2 recombinante interagit, *in vitro,* avec les ARN BC1 et BC200

Les ARN BC1, BC200 et le snRNA U1 ont été produits, sous forme radioactive, par transcription *in vitro* et incubés avec la protéine hnRNP-A2 ajoutée en concentrations croissantes (0,4 et 0,6 µM) et avec des ARNt compétiteurs, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. L'ARN BC1 servait de contrôle positif (pistes 1 à 3) et le snRNA U1 de contrôle négatif (pistes 7 à 9). Les étoiles indiquent les complexes formés entre les ARN et la protéine.

structure que nous avons établi pour l'ARN BC200 ***(Figure 52 et 54, pages 211 et 215)***, celui-ci ne contient pas de motif similaire. Des motifs de fixation de la protéine hnRNP-A2 ont déjà été définis dans d'autres ARN, en particulier dans l'ARNm codant la protéine MBP. Il s'agit d'une séquence de 11 nt (motif A2RE11) ***(Figure 63A/)*** (Munro et al, 1999). Cette séquence suffit à adresser des ARN chimériques dans les prolongements neuritiques grâce à une interaction avec la protéine hnRNP-A2 (Shan et al, 2003). Une séquence très similaire au motif A2RE11 est localisée dans la partie Alu de l'ARN BC200 (nt 71 à 81) ***(Figure 63B/)***. Au sein du motif A2RE11, la conservation des nucléotides en positions 5, 6, 8 et 9 est absolument requise pour la fixation de la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 63A/)*** (Munro et al, 1999). De manière très intéressante, l'identité de ces nucléotides est conservée dans le motif homologue présent dans l'ARN BC200 ***(Figure 63B/)***. Dans un premier temps, afin de tester si cette séquence, au sein de l'ARN BC200, pouvait correspondre au site de fixation de la protéine hnRNP-A2, la protéine recombinante a été incubée avec le domaine Alu de l'ARN BC200 (BC200N120) ***(Figure 55, page 217)***. D'après nos résultats, cet ARN ne formait pas de complexe avec la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 64A/, pistes 5 et 6)***. Par contre, l'ARN BC200Δ51-125, dans lequel la partie 3' terminale du domaine Alu contenant le site A2RE potentiel est éliminé, interagissait toujours avec la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 64A/ pistes 8 et 9)***. La région 3' terminale du domaine Alu (nt 51 à 125) ne semblait donc pas nécessaire à l'interaction. Ce résultat avait été conforté par l'absence de compétition de l'ARN BC200N120 non-radioactif vis-à-vis de l'ARN BC200 lors du test de fixation sur la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 64B/ pistes 9 et 10)***. L'ensemble de ces données suggère que le site A2RE putatif de l'ARN BC200 n'interagit pas avec la protéine hnRNP-A2.

L'ARN BC200Δ133-165, dans lequel le domaine Poly A a été éliminé, n'interagissait pas avec la protéine hnRNP-A2, ce qui suggérait que le domaine Poly A pourrait être responsable de la fixation de l'ARN BC200 sur la protéine hnRNP-A2 ***(Figure 64B/, pistes 11 et 12)***. De manière intéressante, lorsque des expériences de compétition avait été réalisées entre les ARN BC1 et BC200, nous avions constaté qu'un excès d'ARN BC1 compétiteur déplaçait la protéine hnRNP-A2 fixée sur l'ARN BC200 ***(Figure 64B/, pistes 6 et 7)*** et vice et versa ***(Figure 64B/, pistes 3 et 4)***. Autrement dit ces deux ARN étaient capables d'entrer en compétition pour la fixation de la protéine hnRNP-A2, *in vitro*, ce qui suggèrait qu'ils partagent un site de fixation commun pour la protéine hnRNP-A2. Or, le

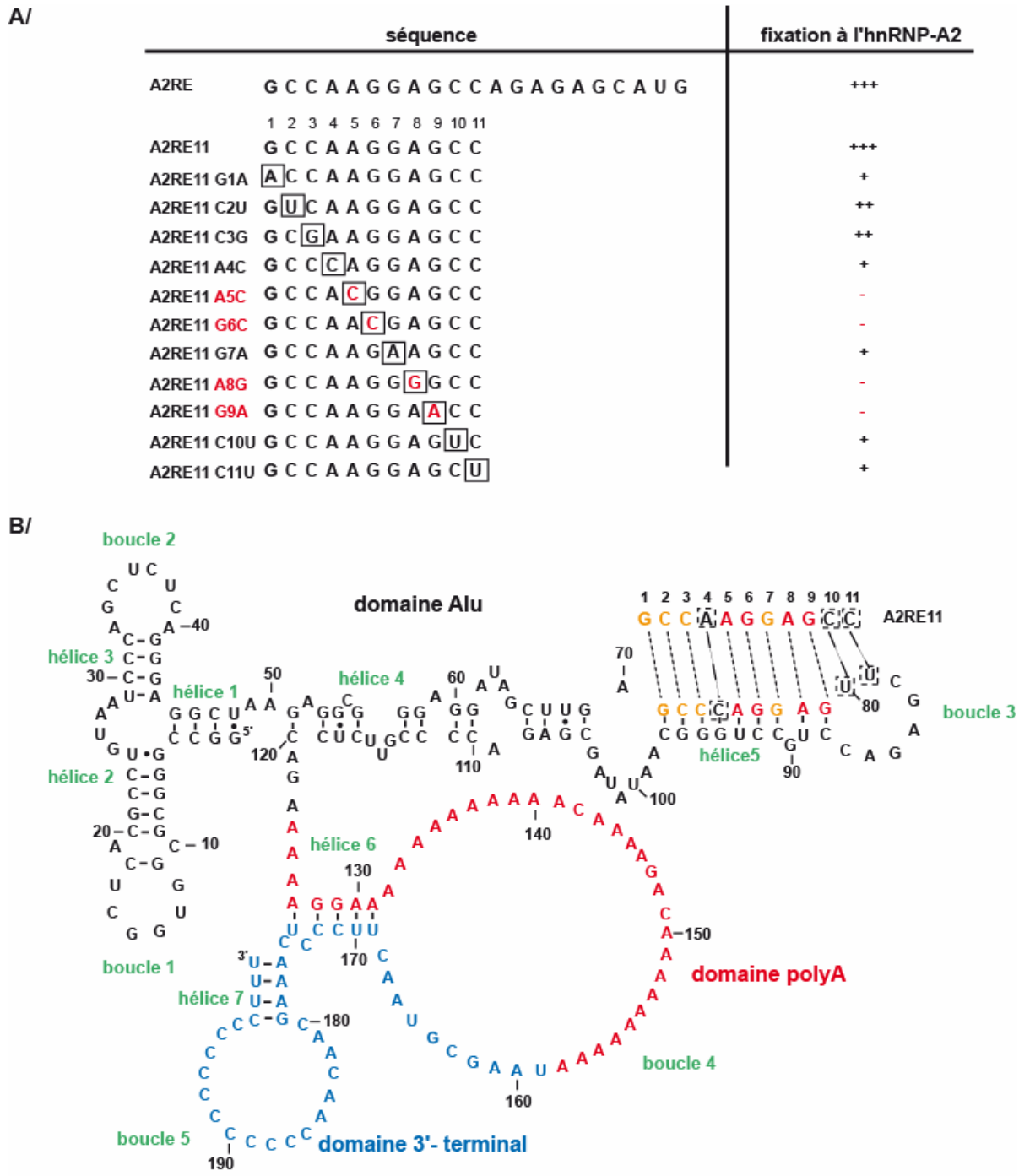


Figure 63 : Une séquence similaire au motif A2RE de l'ARNm de MBP est présente dans l'ARN BC200

A/ *Séquences A2RE testées pour leur interaction avec l'hnRNP-A2 (Munro et al, 1999). Les bases mutées au sein de la séquence A2RE sont encadrées. La capacité de fixation de la protéine hnRNP-A2, aux séquences A2RE mutées, est indiquée par des « + ». Au sein du motif A2RE11, la conservation des nucléotides en position 5, 6, 8 et 9, indispensable à la fixation de la protéine hnRNP-A2, est indiquée en rouge.* ***B/*** *Comparaison du motif A2RE11 et d'une séquence contenue dans l'ARN BC200. Les nucléotides en position 5, 6, 8 et 9 sont indiqués en rouge, les nucléotides communs à la séquence A2RE11 et à la séquence de l'ARN BC200 sont indiqués en orange et les nucléotides différents sont encadrés et en noir.*

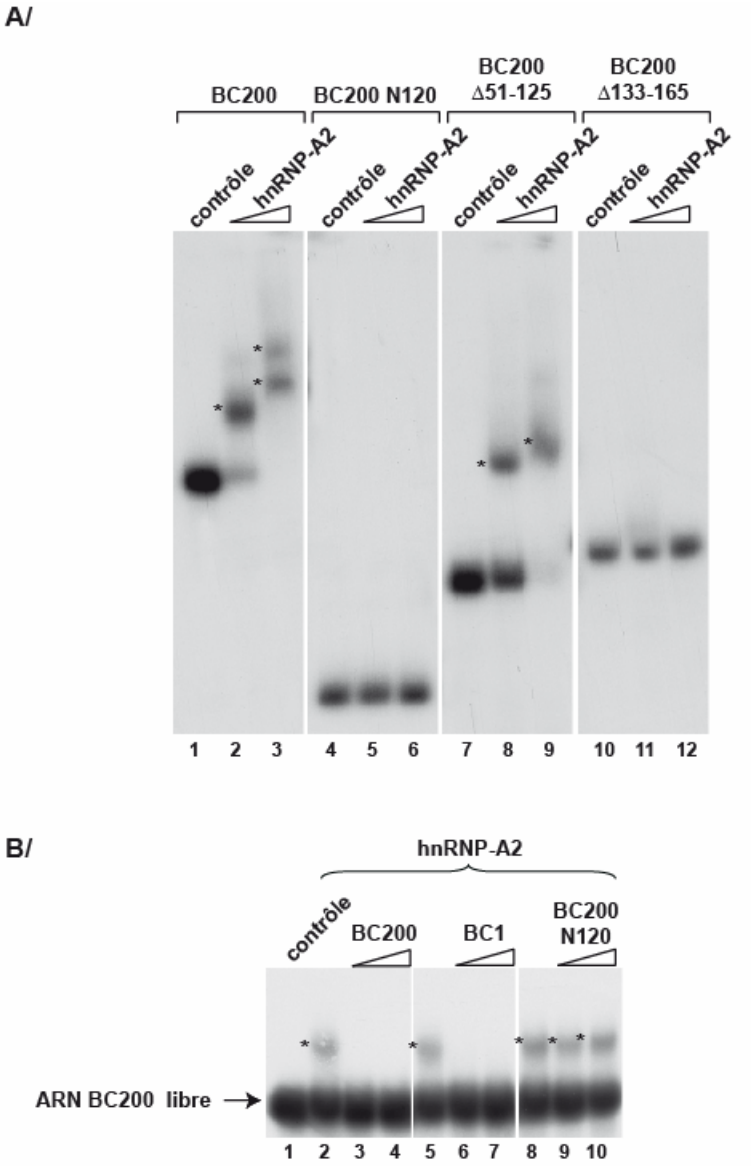


Figure 64 : Recherche du ou des domaines de fixation de la protéine hnRNP-A2 sur l'ARN BC200

A/ Les ARN BC200 sauvage et mutants ont été produits, sous forme radioactive, par transcription *in vitro* et incubés avec la protéine hnRNP-A2 en concentration croissante (0,4 et 0,6 µM) avec des ARNt compétiteurs, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les étoiles indiquent les complexes formés entre les ARN et la protéine. **B/** Expérience de compétition. L'ARN BC200 a été produit, sous forme radioactive, par transcription *in vitro*, incubés avec la protéine hnRNP-A2 recombinante et des concentrations croissantes d'ARN compétiteurs non-radioactifs (ARN BC200 : pistes 3 et 4, ARN BC1 : pistes 6 et 7, ARN BC200 N120 : pistes 9 et 10).

seul élément commun à ces deux ARN est la séquence Poly A. Ces données renforcent l'idée que la protéine hnRNP-A2 reconnaisse le domaine Poly A au sein des ARN BC1 et BC200. La détection de plusieurs complexes pouvait donc correspondre à la fixation de plusieurs molécules de protéine hnRNP-A2 sur la séquence Poly A.

J'avais aussi testé la capacité d'interaction de la protéine hnRNP-A2 avec l'ARN BC200N158 ***(Figure 65)***, qui ne contient plus le domaine 3' terminal de l'ARN BC200 (nt 159-200). Cet ARN avait une affinité pour la protéine hnRNP-A2 plus faible que l'ARN BC200 entier. Par ailleurs, un seul type de complexe était formé ***(Figure 65, piste 3)***, pour des concentrations en protéines pour lesquelles plusieurs complexes étaient observés pour l'ARN BC200 entier ou l'ARN BC200Δ51-125. Ces résultats suggérent, soit que le domaine 3' de l'ARN BC200 contient un deuxième site de fixation pour la protéine hnRNP-A2, soit que sa présence stabilise une structuration du domaine Poly A, ce qui en favoriserait la fixation de la protéine hnRNP-A2. En effet, en plaçant le domaine Poly A en boucle à l'extrémité d'une hélice, le domaine 3' terminal pourrait faciliter la fixation et l'oligomérisation de la protéine hnRNP-A2 sur la séquence du Poly A. Cette hypothèse pourra être testée en produisant l'ARN BC200N174 dans lequel la séquence Poly A sera fermée par une hélice. Bien sûr, l'emploi de la technique d'empreintes pourra permettre de confirmer et d'affiner les données que nous avons obtenues par les expériences de retard sur gel.

III/ Conclusions et perspectives

1/ Comment la protéine hnRNP-A2 interagit-elle avec l'ARN BC200 ?

L'ensemble de nos données suggèrent que la séquence Poly A est responsable de la fixation de la protéine hnRNP-A2 aux ARN BC200 et BC1 *in vitro*. Ces données ne sont pas en accord avec celles de l'équipe de Tiedge qui propose une interaction de la protéine hnRNP-A2 avec une boucle interne formant des paires de bases non canoniques dans

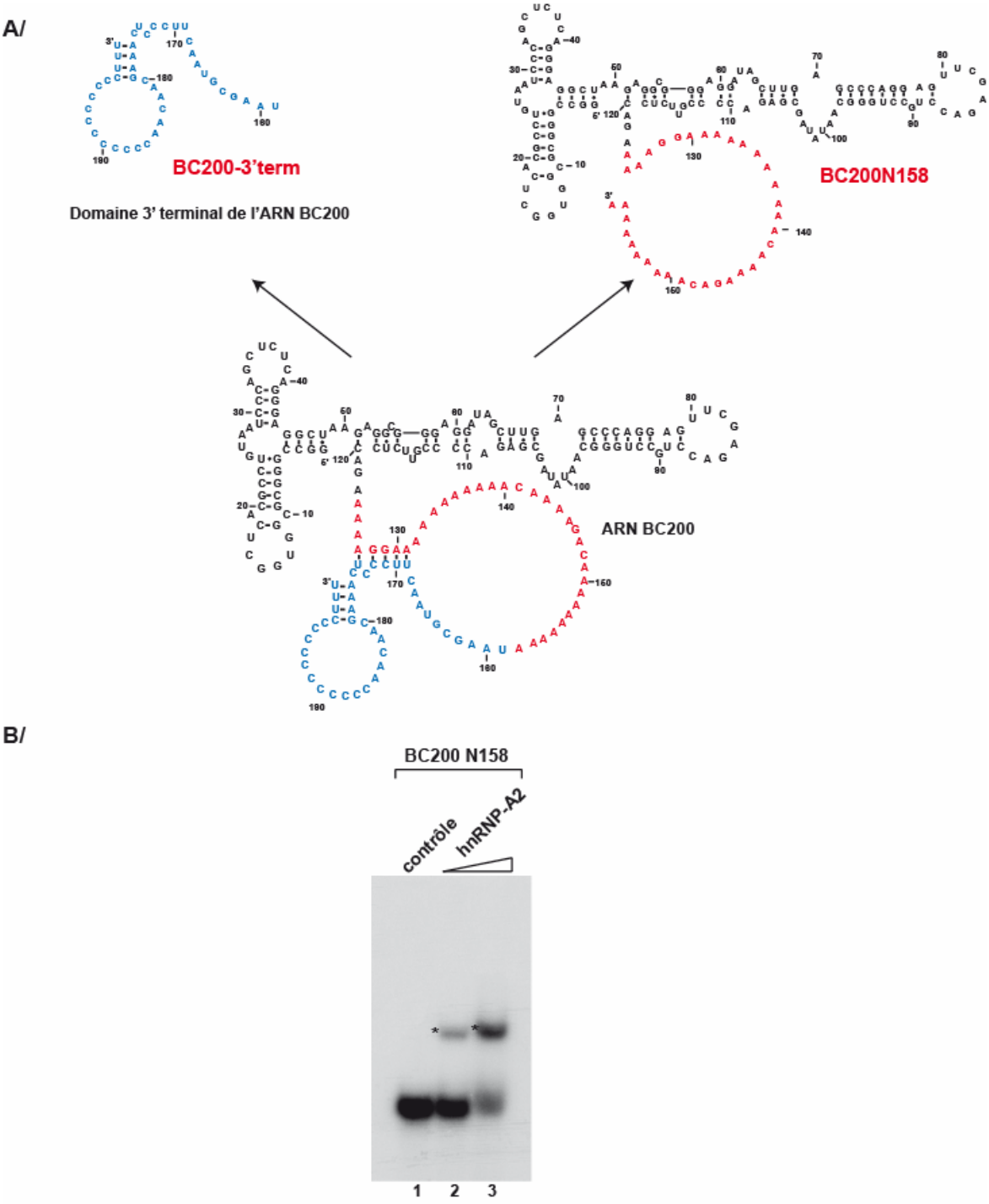


Figure 65 : L'absence du domaine 3' terminal de l'ARN BC200 diminue l'affinité de cet ARN pour la protéine hnRNP-A2

A/ Représentation schématique de la structure des mutants BC200 N158 et BC200 3' term. **B/** Expérience de retard sur gel réalisées avec les ARN BC200 N158 et la protéine hnRNP-A2 recombinante. L'ARN BC200 N158 a été produit par transcription *in vitro* et incubé avec la protéine hnRNP-A2 en concentration croissante (0,4 et 0,6 µM) et avec des ARNt compétiteurs, comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les étoiles indiquent les complexes formés entre l'ARN et la protéine.

l'ARN BC1 (Muslimov et al, 2006). Comme nous l'avons déjà remarqué, l'interaction mise en évidence par cette équipe n'est peut-être pas directe, ce qui expliquerait cette différence. Nous produirons un mutant de l'ARN BC1 où cette structuration particulière sera affectée afin de savoir s'il y a toujours fixation de la protéine hnRNP-A2 recombinante sur l'ARN BC1.

Par ailleurs, afin de préciser les sites de fixation de la protéine hnRNP-A2 recombinante sur les deux ARN BC200 et BC1, nous réaliserons des expériences d'empreintes comme nous l'avons fait pour le complexe SMN. Nous pouvons aussi réaliser en complément des expériences d'interférence de modifications. L'ARN est modifié de manière ménagée avec des agents chimiques et incubé avec la protéine. L'analyse des positions des modifications dans les ARN qui ont pu former un complexe avec la protéine permet d'identifier les modifications qui empêchent la formation de ce complexe et donc les segments de l'ARN important pour l'interaction. Si nous vérifions bien, par ces approches, que la séquence Poly A constitue le site de fixation de la protéine hnRNP-A2, il faudra savoir comment la présence du domaine 3' et favorise l'interaction et quel segment de ce domaine est impliqué. De plus, il nous faudra également vérifier si la formation d'une hélice fermant le domaine Poly A est importante pour cette interaction.

Nous envisageons aussi de réaliser des expériences de compétition avec des ARN Poly A mimant le domaine Poly A et des ARN Poly C mimant le domaine riche en résidus C.

Il sera aussi intéressant de savoir combien de molécules de protéine hnRNP-A2 peuvent se fixer sur les ARN BC200 et BC1. Un équipement permettant de définir la stoechiométrie des complexes vient d'être acquis au laboratoire et permettra de répondre à cette question.

2/ Rôle fonctionnel possible de la fixation de la protéine hnRNP-A2 à l'ARN BC200 in vivo

Les domaines Poly A des ARN BC1 et BC200 fixent aussi la protéine PABP (Muddashetty et al, 2002 ; West et al, 2002 ; Mullin et al, 2004 ; Kondrashov et al, 2005 ; Wang et al, 2005 ; Wang et al, 2002 ; Khanam et al, 2006). Il sera donc important d'évaluer

l'affinité relative des protéines PABP et hnRNP-A2 pour ces ARN ceci afin de savoir quel peut être l'impact de la fixation potentielle de la protéine hnRNP-A2 sur cette région.

Selon les données de Tiedge et al., la protéine hnRNP-A2 permettrait le transport de l'ARN BC1 dans les dendrites (Muslimov et al, 2006). Il sera intéressant de tester par la technique d'hybridation *in situ* si l'extinction de la protéine hnRNP-A2 par ARN interférence bloque le transport de l'ARN BC200 dans des neuroblastomes humains en culture (SH-SY5Y), ou celle de l'ARN BC1 dans des neurones primaires d'hypothalamus de rat. Ces expériences seront réalisées en collaboration avec F. Rage. Comme nous l'avons déjà mentionné, des ARN anti-sens s'hybridant spécifiquement aux régions 3' terminales des ARN BC1 et BC200 ont déjà été réalisées ***(Figure 61, page 230)***.

Chapitre III : Mise en évidence et caractérisation d'une interaction entre le complexe SMN et la particule SRP

I/ Intérêt de l'étude

En plus de l'étude du rôle spécifique possible du complexe SMN dans les neurones, un autre objectif de ma thèse était d'étudier le rôle du complexe SMN dans l'assemblage de RNP ubiquitaires. Comme décrit en introduction, le seul rôle parfaitement établi du complexe SMN est sa participation à l'assemblage des UsnRNP spliceosomales. Or, il existe une autre particule ribonucléoprotéique ubiquitaire, la particule de reconnaissance du signal ou SRP (*Signal Recognition Particule*), qui assure la sécrétion des protéines au travers du réticulum endoplasmique (pour revue, Egea et al, 2005). Chez l'homme, la particule SRP est constituée de l'ARN 7S et de six protéines nommées SRP 9, 14, 19, 54, 68 et 72. L'assemblage de cette particule se déroule en 2 temps. Dans le nucléole, les protéines SRP 9, 14, 19, 68 et 72 interagissent avec l'ARN 7S pour former la pré-particule SRP, qui est ensuite exportée dans le cytoplasme. La fixation de la protéine SRP 54 dans le cytoplasme conduit à la production de la particule SRP active ***(Figure 39, page 127)*** (Politz et al, 2000). Comme les UsnRNP, cette particule ARN/protéines est abondante dans toutes les cellules eucaryotes (pour revue, Bovia & Strub, 1996). C'est pourquoi nous nous sommes posés la question d'un rôle possible du complexe SMN dans son assemblage. Répondre à cette question paraissait d'autant plus intéressant qu'aucun facteur d'assemblage n'avait été identifié pour cette particule.

II/ Stratégie utilisée et résultats obtenus

L'implication du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP pouvait se traduire par une interaction de l'ARN 7S et/ou de certaines protéines de la particule

SRP avec le complexe SMN. Dans un premier temps, nous avons testé si l'ARN 7S était capable d'interagir *in vitro* avec le complexe SMN purifié.

1/ Test d'interaction entre l'ARN 7S et le complexe SMN purifié

La stratégie était la même que celle employée pour l'étude de l'interaction entre le complexe SMN et l'ARN BC200, à savoir la production de l'ARN 7S par transcription *in vitro* avec marquage par incorporation d'UTP [α^{32}-P] suivie du test de son interaction avec le complexe SMN, purifié à partir de cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine Flag-Gemin2. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, le clonage du cDNA de l'ARN 7S, dans le plasmide pUC18 sous contrôle d'un promoteur T7, avait déjà été réalisé par F. Schlotter ce qui m'a ensuite permis de produire l'ARN.

En incubant l'ARN 7S produit sous forme radioactive par transcription *in vitro* avec le complexe SMN purifié, nous avons pu montrer l'existence d'une interaction ***(Figure 66B/)***. Cette interaction semblait plus faible comparée à celle observée pour le snRNA U1. Néanmoins, cette interaction s'est avérée être reproductible dans plusieurs expériences, nous avons donc considérée qu'elle était significative.

Comme nous l'avons déjà mentionné, un modèle de structure secondaire basé sur des données expérimentales existe pour l'ARN 7S ***(Figure 66A/)***. Comme précédemment, afin d'étudier le ou les élément(s) de cet ARN reconnu(s) par le complexe SMN, plusieurs constructions ont été réalisées pour produire des ARN 7S tronqués par transcription *in vitro*. Ces ARN correspondent aux différents domaines structuraux de l'ARN 7S ***(Figure 67)***. Ainsi, le domaine Alu (7S del2), le domaine S et deux fragments du domaine Alu (7S del1 et 7S del4) ont été produits. L'emploi des transcrits correspondant nous a permis de montrer que, pris séparément, les différents domaines de l'ARN 7S n'interagissent pas avec le complexe SMN ***(Figure 68)***. Il semble donc que la molécule d'ARN 7S entière soit nécessaire pour qu'il y ait interaction.

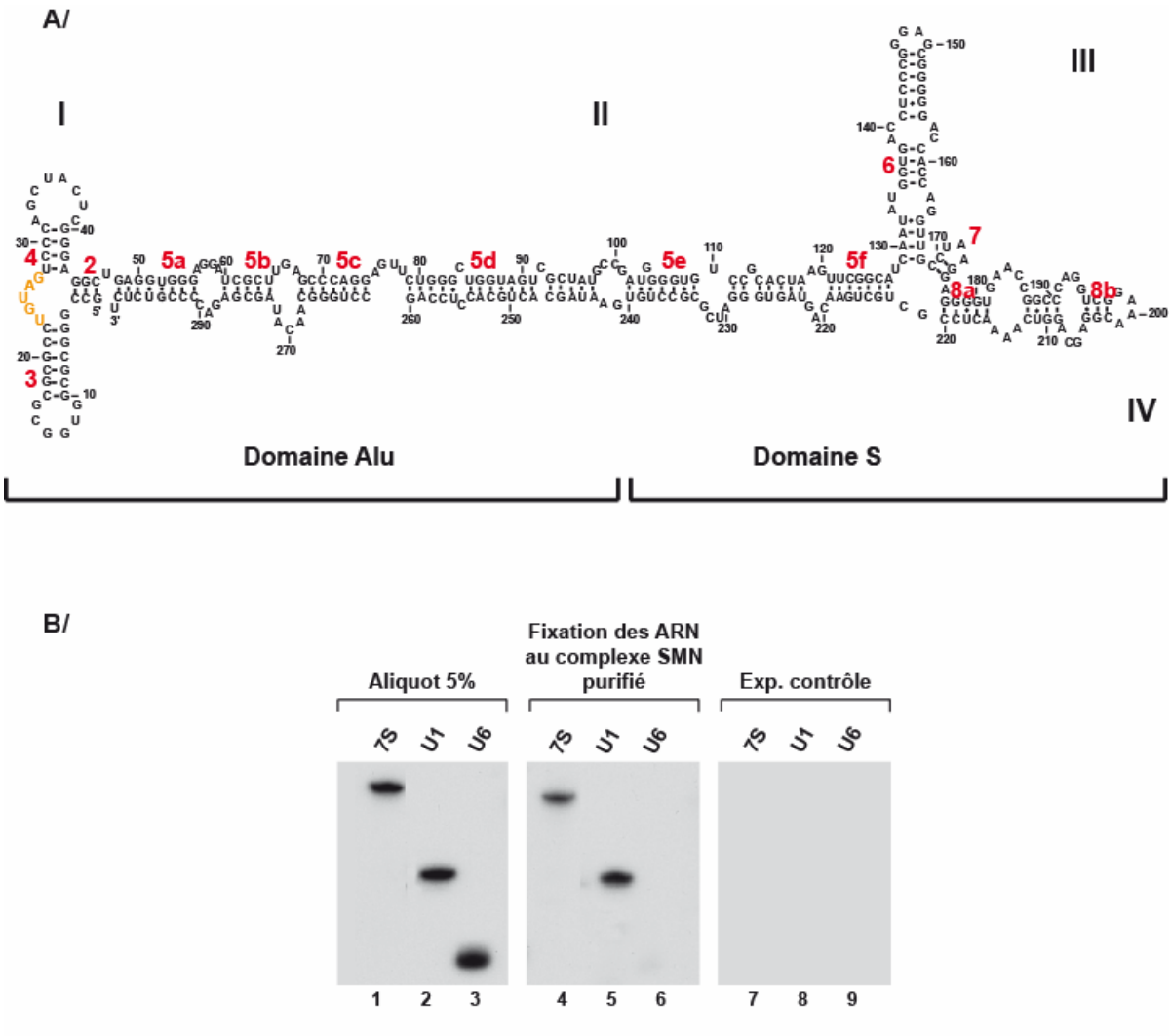


Figure 66 : L'ARN 7S se fixe sur le complexe SMN purifié

A/ Représentation de la structure 2D de l'ARN 7S selon Wild et al, (2002). Le domaine Alu et le domaine S sont indiqués. Les quatre domaines structuraux de l'ARN 7S sont numérotés en chiffres romains. Les hélices sont numérotées en chiffres arabes indiqués en rouge (Larsen & Zwieb, 1991). **B/** Test de l'interaction entre les snRNA U1 et U6 et l'ARN 7S produits sous forme radioactive par transcription *in vitro* avec le complexe SMN purifié. Les snRNA U1 et U6 servaient respectivement de contrôles positif et négatif. Les différents ARN ont été incubés en présence du complexe SMN purifié, immobilisé sur billes d'agarose (Fixation des ARN au complexe SMN purifié, pistes 4 à 6) ou en présence des billes d'agarose incubées avec un extrait ne contenant pas la protéine Flag-Gemin2 (Exp. contrôle, pistes 7 à 9). Après lavage des billes, les ARN décrochés du complexe SMN ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 10%. 5% de la quantité d'ARN utilisée pour chaque analyse ont été fractionnés en parallèle des ARN décrochés du complexe SMN (Aliquot, pistes 1 à 3).

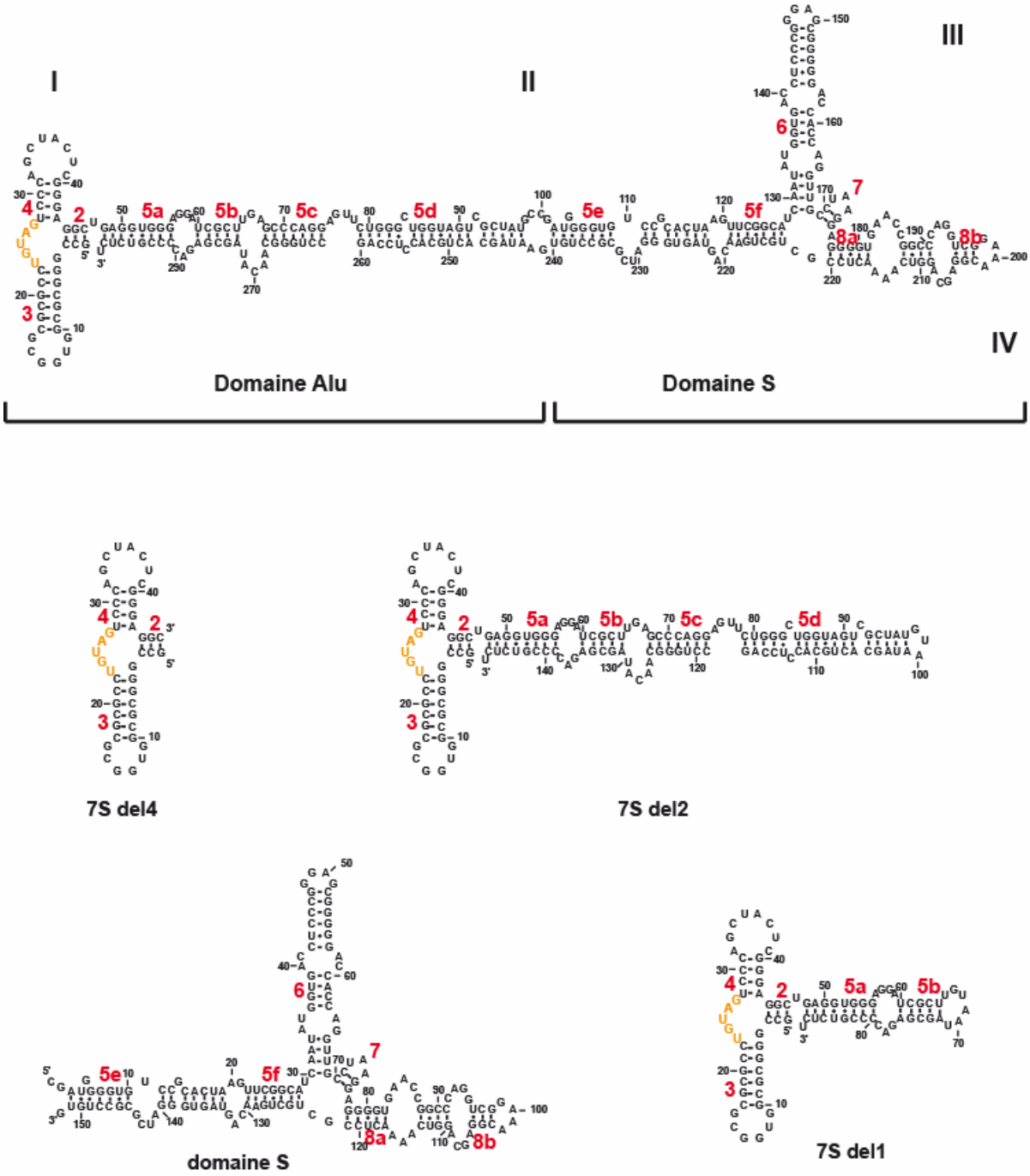


Figure 67 : L'ARN 7S sauvage et les mutants que nous avons produits

La structure secondaire représentée sur cette figure pour chacun des 4 mutants que nous avons produit a été proposée à partir du modèle de structure secondaire établi pour l'ARN 7S sauvage (Wild et al, 2002).

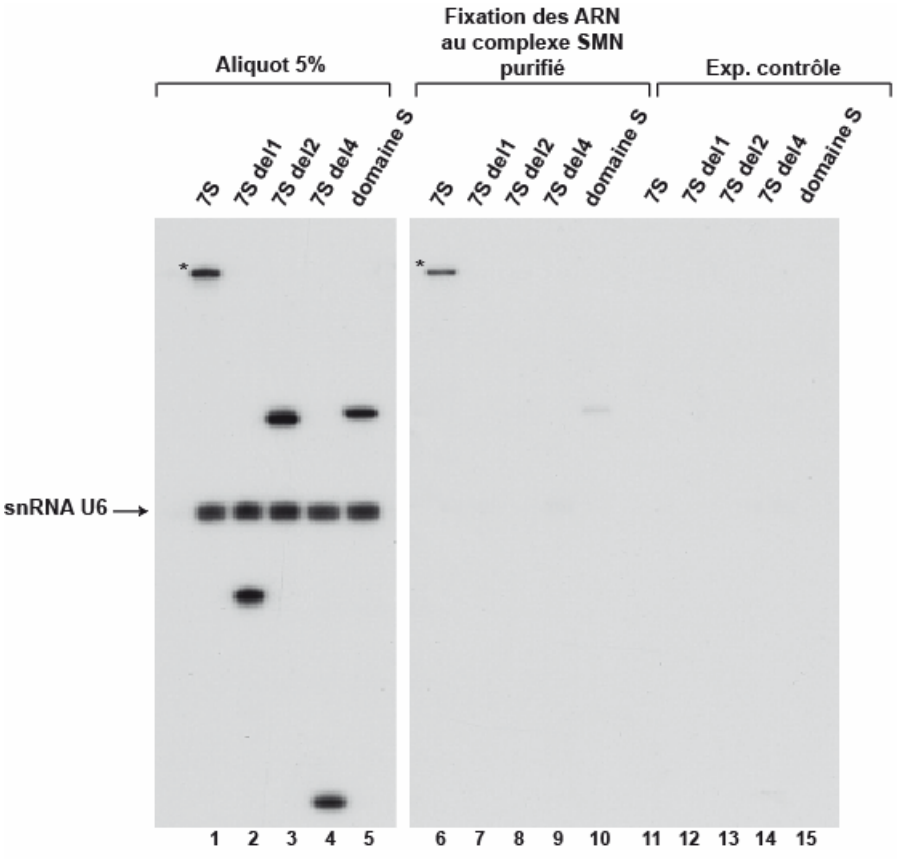


Figure 68: Recherche des domaines de fixation de l'ARN 7S au complexe SMN

Test d'interaction des ARN 7S sauvage et mutants produits sous forme radioactive par transcription *in vitro* avec le complexe SMN purifié. Les snRNA U1 et U6 servaient respectivement de contrôles positif et négatif. Les différents ARN ont été incubés en présence du complexe SMN purifié, immobilisé sur billes d'agarose (Fixation des ARN au complexe SMN purifié, pistes 6 à 10) ou en présence des billes d'agarose incubées avec un extrait ne contenant pas la protéine Flag-Gemin2 (Exp. contrôle, pistes 11 à 15). Après lavage des billes, les ARN décrochés du complexe SMN ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant 10%. 5% de la quantité d'ARN utilisée pour chaque analyse ont été fractionnés en parallèle des ARN décrochés du complexe SMN (Aliquot, pistes 1 à 5).

2/ Test d'une interaction entre le complexe SMN et l'ARN 7S in cellulo

Le fait que le complexe SMN purifié interagisse avec l'ARN 7S *in vitro* suggérait une implication possible de celui-ci dans l'assemblage mais aussi dans la fonction de la particule SRP *in vivo*. Afin d'essayer d'apporter des arguments en faveur de cette hypothèse, nous avons d'abord rechercher si une interaction entre le complexe SMN et la particule SRP pouvait être mise en évidence dans des cellules HEK 293 en culture.

Dans ce but, la première stratégie choisie consistait à exprimer de manière transitoire les protéines de la particule SRP avec une étiquette Flag dans des cellules HEK 293 en culture. Ainsi, nous voulions tester si les protéines de la particule SRP contenues dans les extraits cellulaires préparés à partir de ces cellules transfectées permettaient de co-immunosélectionner le complexe SMN. Avant mon arrivée au laboratoire, F. Schlotter avait déjà cloné les protéines SRP 9, 14, 19 et 54 dans le plasmide Flag-pcDNA3, permettant leur expression dans les cellules HEK 293. La présence du complexe SMN a été recherchée par la technique de Western-Blot, en utilisant des anticorps spécifiques de chacune des protéines du complexe ***(Figure 69)***. Les résultats se sont avérés négatifs. Comme le montre la figure 68, les protéines SRP 9 et 19, étaient bien exprimées dans les cellules ***(Figure 69, pistes 1 et 2)*** et leur immunosélection était efficace ***(Figure 69, pistes 5 et 6)***. Cependant, aucun signal n'était obtenu lorsque les composant du complexe SMN étaient testés (protéines SMN et Gemin 2), ce qui indique que les protéines SMN et Gemin 2 n'étaient pas co-immunosélectionnées, en quantité décelable dans les conditions expérimentales, utilisées avec la protéine Flag-SRP 9 ou Flag-SRP 19 ***(Figure 69, pistes 5 et 6)***. Il est à remarquer que les protéines SMN et Gemin 2 étaient pourtant co-immunosélectionnées dans l'expérience contrôle réalisée avec des extraits cellulaires préparés à partir de cellules exprimant la protéine Flag-Snurportin-1 ***(Figure 69, piste 8)***. Nous ne pouvons pas exclure que la présence du peptide Flag en N-terminal des protéines SRP 9 et SRP 19 empêche leur incorporation dans la particule SRP. Nous n'avions pas pu réaliser des expériences similaires avec les protéines SRP14 et SRP54 car nous n'avions pas réussi à les exprimer dans les cellules HEK 293 *(résultats non illustrés)*.

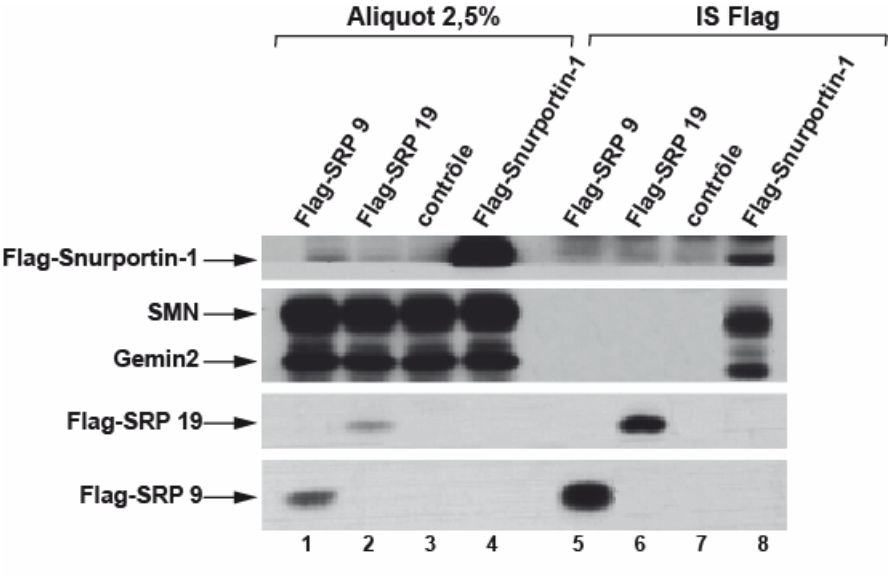


Figure 69 : Recherche d'une interaction entre les protéines Flag-SRP 9 et Flag-SRP 19 et le complexe SMN

Les protéines Flag-Snurportin-1, Flag-SRP9 ou Flag-SRP19 ont été exprimées transitoirement dans les cellules 293T. Des extraits totaux ont été préparés à partir de cellules HEK 293 exprimant de manière transitoire les protéines Flag-SRP 9, Flag-SRP 14 et Flag-Snurportin-1 et incubés avec des anticorps anti-Flag immobilisés sur billes d'agarose comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les protéines co-immunosélectionnées aux protéines portant l'étiquette Flag (IS Flag, pistes 5 à 8) ont été fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et révélées par la technique de Western-Blot à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque protéine. Une expérience témoin a été réalisée en transfectant les cellules par le plasmide Flag-pcDNA3 vide (Contrôle). 2,5% de la quantité des extraits totaux utilisées par chaque immunosélection ont été fractionnés par électrophorèse en gel dénaturant SDS-PAGE (Aliquot 2,5%, pistes 1 à 4).

Nous n'avons pas non plus réussi à mettre en évidence l'association de l'ARN 7S avec le complexe SMN dans des extraits de cellules HEK 293 par la technique de Northern-blot, pour les mêmes raisons techniques décrites dans le chapitre précédent concernant l'interaction entre le complexe SMN et l'ARN BC200.

Face aux difficultés rencontrées avec les approches décrites ci-dessus, pour rechercher si une interaction peut exister *in vivo* entre le complexe SMN et l'ARN 7S, nous avons alors décidé d'utiliser la technique d'injection d'ARN dans les oocytes de *X. laevis*. Cette technique avait permis d'étudier l'assemblage des UsnRNP (Mattaj & De Robertis, 1985 ; Mattaj, 1986) et de mettre en évidence des interactions entre les UsnRNA et le complexe SMN (Fischer et al, 1997 ; Yong et al, 2002 ; Yong et al, 2004a).

3/ Utilisation de l'approche basée sur la micro-injection dans les oocytes de X. laevis

Les oocytes de *X. laevis* constituent un bon modèle pour l'étude de la localisation des ARN. En effet, ils peuvent être facilement micro-injectés, soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme (pour revue, King et al, 2005). En effet, la grande taille des ovocytes (0,4 mm de diamètre) permet une injection directe dans ces deux compartiments cellulaires. Il est néanmoins nécessaire d'avoir une expertise approfondie pour pouvoir manier cette technique délicate, c'est pourquoi nous avons établi une collaboration avec A. Méreau (UMR 6061, Rennes, France).

3.1/ Etude de l'interaction entre le complexe SMN et l'ARN 7S

En collaboration avec A. Méreau, j'ai réalisé des injections d'un mélange d'ARN 7S, 7S del2, et des snRNA U1 et U6 radiomarqués dans le noyau des oocytes de *X. laevis* ***(Figure 70)***. Ces expériences ont été menées au cours de 3 séjours que j'ai effectués à Rennes. Le protocole de préparation, d'injection et de fractionnement des oocytes est décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Dans toutes ces injections, le snRNA U1 a servi de contrôle positif et le snRNA U6 de contrôle négatif. Comme toutes nos injections étaient effectuées dans le noyau des oocytes et que le snRNA U6 n'est pas exporté dans le

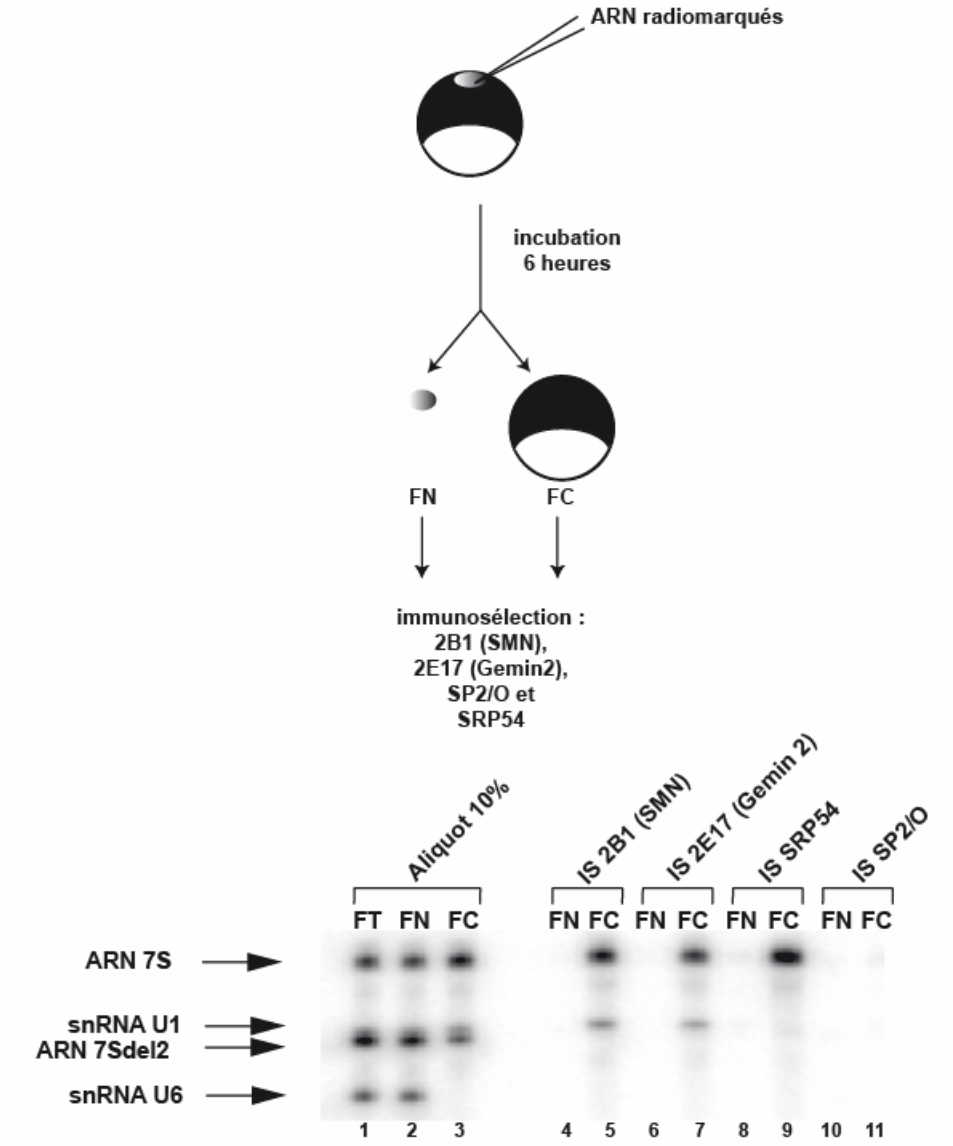


Figure 70 : Mise en évidence d'une interaction entre l'ARN 7S injecté dans les oocytes de *X. laevis* et les protéines du complexe SMN

Après injection d'un mélange d'ARN 7S, 7S del2, des snRNAU1 et U6 radiomarqués, dans le noyau des oocytes de *X. laevis*, et incubation, les oocytes ont été fractionnés comme décrit dans la partie *Matériels et Méthodes*. Les fractions nucléaires (FN) et cytoplasmiques (FC) ont été incubées avec les anticorps 2B1 (anti-SMN, pistes 4 et 5), 2E17 (anti-gemin2, pistes 6 et 7), anti-SRP54 (pistes 8 et 9) et SP2/O (sérum préimmun, pistes 10 et 11) fixés à des billes de G-sépharose. Le snRNA U1 est utilisé comme contrôle positif et le snRNA U6 et l'ARN 7Sdel2 comme contrôles négatifs. Les ARN décrochés des billes ont ensuite été fractionnés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. 10% de la quantité des fractions utilisées pour chaque analyse ont été fractionnés en parallèle (Aliquot 10%, pistes 1 à 3). FT représente une fraction totale et sert de témoin d'injection. IS : immunosélection.

cytoplasme, il nous servait en plus à vérifier que nous faisions bien les injections dans le noyau. Le mutant 7S del2 a été choisi parmi les différents mutants que nous avions produits car nous savions qu'il est stable dans les oocytes, qu'il s'associe aux protéines SRP 9 et 14 dans le nucléole, et qu'il est exporté dans le cytoplasme, contrairement au domaine S (Jacobson & Pederson, 1998). Nous avions montré, que ce mutant n'interagit pas avec le complexe SMN, *in vitro*. Il constituait donc un second contrôle négatif pour nos expériences d'immunosélection. Après l'injection des ARN dans le noyau des oocytes de *X. laevis*, les oocytes ont été incubés pendant 6 heures à 16°C avant leur fractionnement nucléocytoplasmique. Ce temps avait déjà été décrit comme nécessaire pour qu'une fraction de molécules d'ARN 7S s'associe aux protéines SRP 9, 14, 19, 68 et 72 dans le nucléole et que la pré-particule SRP soit exportée dans le cytoplasme (He et al, 1994). J'ai vérifié que ce temps d'incubation permettait bien d'obtenir une répartition égale des ARN entre le noyau et le cytoplasme *(résultats non illustrés)*. Des immunosélections ont ensuite été réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines SMN (2B1), Gemin2 (2E17) et SRP 54 sur les fractions cytoplasmiques et nucléaires obtenues à partir des oocytes injectés. Comme attendu, les résultats montraient que le snRNA U1 était immunosélectionné avec les anticorps 2B1 (SMN) et 2E17 (Gemin 2) dans la fraction cytoplasmique contrairement au snRNA U6 ***(Figure 70 B/, pistes 5 et 7)***. Nos résultats indiquaient également que l'ARN 7S injecté était immunosélectionné par l'anticorps SRP54 dans le cytoplasme ***(Figure 70 B/, piste 9)***. Enfin, ces résultats nous indiquent que l'ARN 7S est immunosélectionné par les anticorps 2B1 (SMN) et 2E17 (Gemin2) dans les fractions cytoplasmiques mais pas dans les fractions nucléaires ***(Figure 70 B/, pistes 4 à 7)***. Dans nos conditions expérimentales, l'ARN 7S interagissait, donc, avec le complexe SMN uniquement dans le cytoplasme.

3.2/ Importance possible du complexe SMN dans la mise en place de l'interaction entre la protéine SRP 54 et l'ARN 7S

Nos résultats précédents montraient que le complexe SMN est associé avec l'ARN 7S uniquement dans le cytoplasme. Une explication possible était que le complexe SMN intervienne tardivement dans l'assemblage de la particule. En effet, la protéine SRP 54 est la dernière protéine de la particule SRP à interagir avec l'ARN 7S et c'est la seule protéine

qui est associée à la particule dans le cytoplasme. Le complexe SMN pourrait donc participer à la fixation de cette dernière protéine à la pré-particule SRP. Pour tester cette hypothèse, toujours en collaboration avec A. Méreau, nous avons injecté des anticorps dirigés contre la protéine SMN (2B1) ou contre la protéine Gemin2 (2E17) dans le cytoplasme des oocytes de *X. laevis*, ceci dans le but de bloquer la fonction possible du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP. Des anticorps dirigés contre la protéine SRP54 ont également été injectés dans le cytoplasme des oocytes. En séquestrant la protéine SRP 54, on s'attendait à inhiber sa fixation à la pré-particule SRP. L'injection d'anticorps non immunogènes (SP2/O) nous servait de témoin négatif, de même que l'expérience réalisée sans injection. L'ARN 7S et le snRNA U6 ont été injectés une heure après dans le noyau. Une incubation des oocytes a alors été réalisée pendant 6 heures à 16°C, comme décrit dans l'expérience précédente ***(Figure 70)***. Des extraits totaux ont alors été préparés à partir des oocytes et ont été utilisés pour réaliser des expériences d'immunosélections en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine SRP 54 (IS SRP 54, pistes 7 à 11) ou contre la protéine SMN (IS 2B1, pistes 2 à 6). Les résultats obtenus sont présentés dans la ***figure 71***. Comme attendu, l'injection d'anticorps contre la protéine SRP 54 diminue son association à l'ARN 7S ***(Figure 71, piste 9)*** par rapport à l'injection d'anticorps contrôle ***(Figure 71, piste 8)*** ou au contrôle sans injection ***(Figure 71, piste 7)***. Par contre, la séquestration de la protéine SRP 54 n'empêche pas l'association de l'ARN 7S au complexe SMN ***(Figure 71, piste 4)***. Nous pouvons également observé que l'injection d'anticorps dirigés contre la protéine SMN (2B1) ou contre la protéine Gemin2 (2E17) conduit à une diminution de la quantité d'ARN 7S associé au complexe SMN ***(Figure 71, pistes 5 et 6)*** mais aussi d'ARN 7S associé à la protéine SRP 54 ***(Figure 71, pistes 10 et 11)***. Ainsi, l'injection d'anticorps dirigés contre la protéine SMN ou contre la protéine Gemin2 et donc la séquestration du complexe SMN, semblent empêcher l'association observée entre la protéine SRP 54 et l'ARN 7S. Ces résultats suggèrent fortement que le complexe SMN soit important pour l'assemblage de la particule SRP. On peut imaginer qu'il participe à la fixation de la protéine SRP 54 sur la pré-particule SRP dans le cytoplasme.

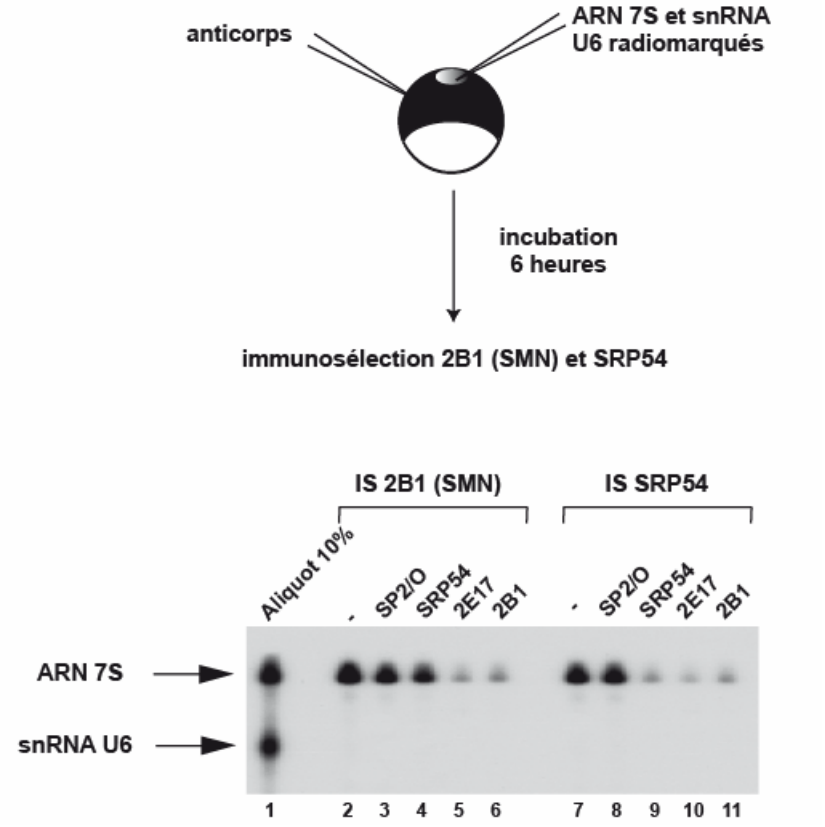


Figure 71 : L'injection des anticorps anti-SMN (2B1) et anti-Gemin2 (2E17) affecte la fixation de la protéine SRP 54 sur l'ARN 7S

Les anticorps dirigés contre les protéines SMN (2B1), Gemin2 (2E17) et SRP 54 ou un anticorps non immunogène (SP2/O) ont été injectés, dans le cytoplasme des oocytes de *X. laevis*, ceci 1 heure avant l'injection de l'ARN 7S et du snRNA U6 dans le noyau. Après 6 heures d'incubation, les extrait totaux ont été préparés et incubés avec les anticorps 2B1 (IS SMN, pistes 2 à 6) et anti-SRP54 (IS SRP54, pistes 7 à 11) fixés à des billes de G-sépharose. Le snRNA U6 était utilisé comme contrôle négatif. Les ARN fixés aux billes ont ensuite été fractionnés par électrophorèse en gel de polyacrylamide. 10% de la quantité d'ARN injectée dans les oocytes ont été fractionnés sur le gel (Aliquot 10%, piste 1), en parallele avec les ARN immunosélectionnés avec les anticorps 2B1 et anti-SRP54

III/ Conclusions et perspectives

1/ Le complexe SMN peut interagir in vitro et s'associe in cellulo avec l'ARN 7S

Nous avons montré de manière reproductible que l'ARN 7S interagit *in vitro* avec le complexe SMN purifié. Malgré le fait que le taux de fixation de l'ARN 7S au complexe SMN soit plus faible que celui observé pour les UsnRNA ou l'ARN BC200, nous pouvons envisager d'identifier les régions d'interaction par la technique d'empreinte basée sur l'emploi des RNases ou par hydrolyse alcaline ménagée. Le fait que les domaines Alu et S de l'ARN 7S ne se fixent pas au complexe SMN, lorsqu'ils sont produits de manière indépendante, indique que l'intégrité de la molécule est nécessaire à la fixation. Les expériences d'injection de l'ARN 7S dans les oocytes de *X. laevis* ont permis de montrer que le complexe SMN est associé à l'ARN 7S dans le cytoplasme mais pas dans le noyau. Il est important de noter que la fixation de certaines des protéines de la particule SRP sur l'ARN 7S induit des changement conformationnels dans cet ARN (Wild et al, 2001 ; Hainzl et al, 2002 ; Kuglstatter et al, 2002 ; Oubridge et al, 2002 et pour revue, Nagai et al, 2003). On peut donc imaginer que ces variations de structure puissent renforcer une interaction directe de l'ARN 7S au complexe SMN.

Par ailleurs, il est possible que l'association du complexe SMN avec la pré-particule SRP et/ou la particule SRP soit largement médiée par des interactions protéine/protéine. L'interaction du complexe SMN, si elle a bien lieu de manière directe *in vivo*, pourrait ainsi être stabilisée par des interactions protéine/protéine. Dans cette optique, il paraît très important de tester si des protéines du complexe SMN interagissent avec des protéines de la particule SRP. C'est ce qu'A. Huttin et F. Schlotter vont tester au laboratoire par l'approche double hybride. Le principe de cette technique est détaillé sur la ***figure 72***. Au cours de son stage de M2R, A. Huttin a sous-cloné chacun des cDNA de toutes les protéines du complexe SMN dans les plasmides utilisés pour cette technique. Le même travail est en cours pour le cDNA des protéines de la particule SRP. Suivant les résultats obtenus, nous pourrons tenir compte de la localisation des sites de fixation des protéines de la particule SRP sur l'ARN 7S pour orienter l'étude des segments de cet ARN qui, en combinaison avec les protéines de la particule SRP, pourraient être impliqués dans l'association de l'ARN 7S au complexe SMN.

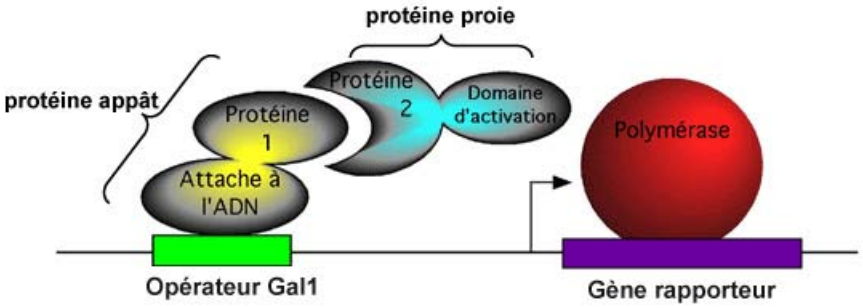


Figure 72 : Principe de la technique de double hybride

Ce système, dans sa version classique, est basé sur la détection des interactions recherchées par détection de l'activation d'un gène rapporteur tel que His3 dont le défaut confère l'auxotrophie pour l'Histidine. L'activation du gène rapporteur est obtenue lorsque l'activateur transcriptionnel Gal4 fonctionnel a pu être reconstitué par interaction des deux protéines 1 et 2 fusionnées l'une au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou LexA, l'autre au domaine d'activation de la transcription de Gal4 ou d'autres activateurs de la transcription.
Vecteurs d'expression : (a) protéine appât : domaine permettant la fixation à l'ADN fusionné à la protéine 1, (b) protéine cible : domaine d'activation de la transcription fusionné à la protéine 2.
Gène rapporteur : gène dont l'expression est facilement observable et dont le promoteur contient un site pour le domaine d'attache à l'ADN de l'appât.

2/ Importance possible du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP

Nos expériences d'injection dans les oocytes de *X. laevis* montrent que le blocage ou la séquestration du complexe SMN, induite par la présence d'anticorps dirigés contre les protéines SMN ou Gemin 2, bloque la fixation de la protéine SRP 54 à l'ARN 7S. Ainsi, le complexe SMN pourrait jouer un rôle essentiel dans la dernière étape d'assemblage de la particule SRP ***(Figure 73)***. Beaucoup de complexes ribonucléoprotéiques s'assemblent par étapes dans des compartiments cellulaires dictincts, ou dans des régions distinctes d'un même compartiment cellulaire. Une explication possible de la séparation physique de certaines des étapes d'assemblage des RNP pourrait être l'existence de processus de régulation et de contrôle qualité à chacune de ces étapes. Ceci permettrait d'éviter la présence de particules ayant des défauts d'assemblage ou de structuration sur leur site d'action. Dans le cas de la particule SRP, il semble essentiel que la protéine SRP 54 soit séquestrée dans le cytoplasme pour permettre le bon déroulement des premières étapes d'assemblage de la particule SRP. On peut imaginer que le complexe SMN joue un rôle dans le contrôle de l'état de la pré-particule SRP, afin d'autoriser l'association de la protéine SRP 54 uniquement sur des pré-particules SRP ayant l'architecture requise. Pour essayer de confirmer que le complexe SMN est nécessaire à la fixation de la protéine SRP 54 à l'ARN 7S, nous pourrons tenter de mettre au point des conditions de reconstitution de la particule SRP dans un extrait de cellules HeLa et tester l'effet produit par l'élimination de la protéine SMN (ou d'une autre protéine du complexe). La protéine SMN pourra soit être immunodéplétée de l'extrait en utilisant l'anticorps anti-SMN (anticorps 2B1), soit son taux pourra être diminué au préalable dans les cellules par la technique de l'ARN interférence. La première méthode consistera à incuber l'extrait de cellules HeLa avec des anticorps dirigés contre la protéine SMN, fixés à des billes de G-sépharose. Plusieurs séries d'incubation avec les billes devront être réalisées pour obtenir une élimination optimale de la protéine SMN. Il est important de souligner que ces deux méthodes ont déjà été utilisées par d'autres équipes, ce qui a permis de montrer que la réduction de la quantité de protéine SMN affecte l'activité d'assemblage du complexe SMN et donc la fixation des protéines Sm sur les UsnRNA (Meister et al, 2001a ; Feng et al, 2005 ; Shpargel & Matera, 2005 ; Grimmler et al, 2005 ; Carissimi et al, 2005 ; Carissimi et al, 2006b ; Girard et al, 2006 ; Otter et al, 2007). L'ARN 7S radiomarqué sera alors incubé

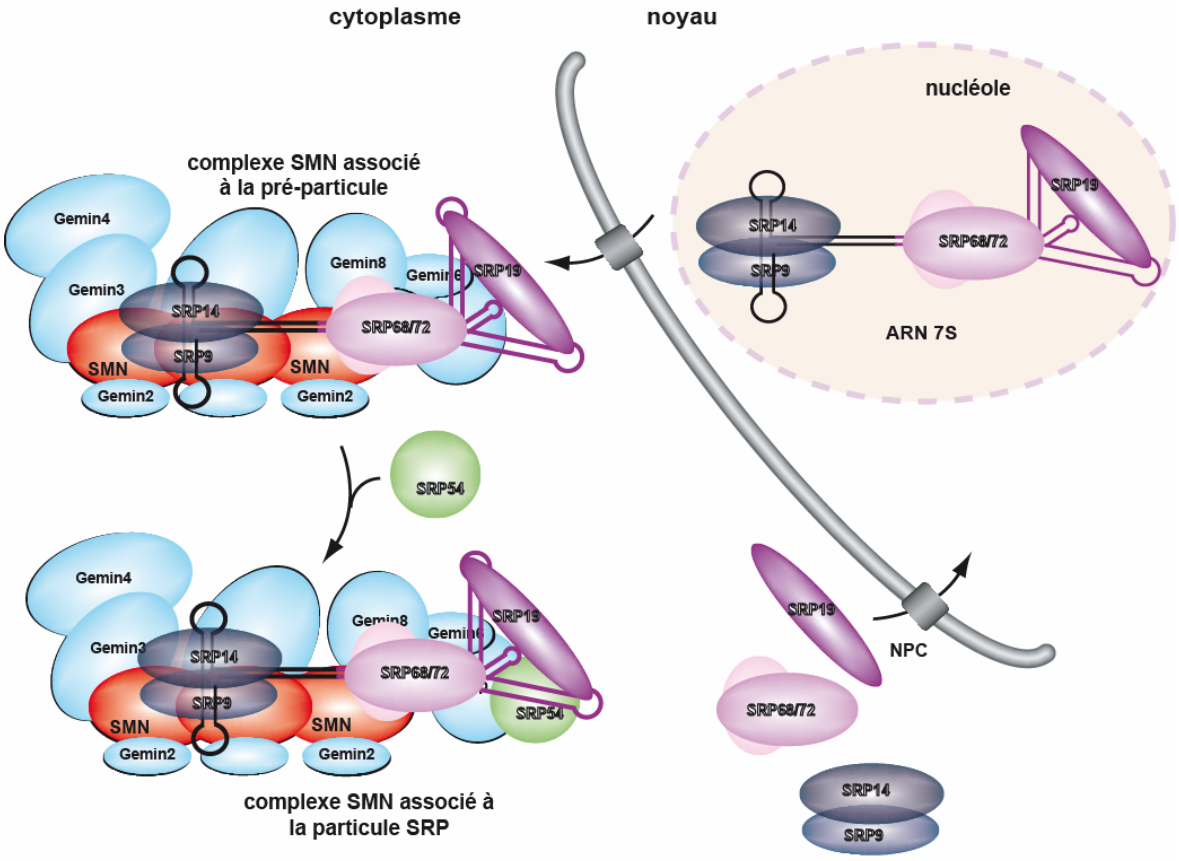


Figure 73 : Représentation schématique de l'implication du complexe SMN dans l'assemblage de la particule SRP

Chez les eucaryotes, l'assemblage de la particule SRP se déroule dans deux compartiments cellulaires : le nucléole et le cytoplasme. Toutes les protéines SRP, à l'exception de la protéine SRP 54, sont transportées dans le nucléole où elles s'assemblent avec l'ARN 7S pour former la pré-particule SRP qui est ensuite exportée dans le cytoplasme. Le complexe SMN pourrait s'associer dans le cytoplasme à la pré-particule et participerait à la fixation de la protéine SRP 54, qui complète l'assemblage de la particule SRP.

avec ces extraits et son association à la protéine SRP 54 sera testée par co-immunosélection et révélée par Western-Blot.

Par ailleurs, les études par double hybride des interactions possibles entre les protéines du complexe SMN et les protéines de la SRP, que nous avons déjà mentionnées plus haut, devraient permettre d'apporter des informations sur les capacités d'interaction du complexe SMN avec (i) la pré-particule SRP et (ii) la protéine SRP 54. En fonction des données obtenues, d'autres tests fonctionnels pourront être envisagés, tels que l'utilisation d'anticorps contre la ou les protéines impliquées du complexe SMN, ou l'expression transitoire de mutants de ces protéines qui puissent constituer des mutants dominants négatifs du processus d'assemblage de la SRP.

Conclusion générale

Conclusion générale

Pendant longtemps, on a pensé que les processus d'assemblage des complexes ribonucléoprotéiques étaient des phénomènes passifs. Aujourd'hui, de nombreuses études montrent que l'assemblage de ces RNP obéit à des mécanismes précis et coordonnés qui font intervenir de nombreux facteurs. Un de ces facteurs est le complexe SMN. En effet, depuis la découverte du gène *SMN* par l'équipe de J. Melki, de nombreuses recherches ont permis de mettre en évidence que le complexe SMN joue un rôle crucial dans l'assemblage et la biogenèse des UsnRNP. Quand cette fonction du complexe SMN avait été découverte par l'équipe de G. Dreyfuss, cette équipe avait déjà proposé que le complexe SMN puisse participer à l'assemblage d'autres RNP. A l'heure actuelle, cette hypothèse n'a pas encore été validée, bien que plusieurs études indiquent un rôle du complexe SMN dans l'assemblage des snoRNP. Les résultats obtenus lors de ma thèse confortent pour la première fois cette hypothèse. En effet, ils suggèrent fortement que le complexe SMN intervienne dans l'assemblage de la particule SRP, plus précisément dans la fixation de la protéine SRP 54 sur l'ARN 7S. Ainsi, la biogenèse d'au moins deux types de RNP ubiquitaires, les UsnRNP et la particule SRP, dont les fonctions sont cruciales pour la viabilité cellulaire, dépendrait du complexe SMN. De nombreuses études sont encore nécessaires afin de décortiquer les mécanismes d'assemblage médiés par le complexe SMN. Notamment, on peut se demander comment le complexe SMN reconnaît spécifiquement chacune des RNP et s'il est impliqué dans le contrôle qualité de l'assemblage de ces RNP.

L'observation de la protéine SMN dans les granules de transport des ARNm dans les neurones indique que cette protéine pourrait participer à la traduction localisée des ARNm dans les axones et dendrites. Contrairement au rôle ubiquitaire de la protéine SMN, peu d'informations sont disponibles sur ce rôle spécifique possible de SMN dans les neurones. On ne sait pas notamment si SMN participerait à ce mécanisme seule ou associée au complexe SMN et à quelle(s) étape(s) de ce processus elle interviendrait : assemblage des

mRNP, transport et/ou contrôle de la traduction. Compte tenu de la fonction bien établie de la protéine FMRP dans le contrôle de la traduction au sein des granules de transport des ARNm neuronaux, le lien physique que nous avons mis en évidence entre la protéine SMN et la protéine FMRP *in vitro* et *in cellulo* apporte un nouvel argument fort confortant l'hypothèse d'un rôle de la protéine et/ou du complexe SMN dans la traduction localisée dans les neurones. La découverte d'une interaction entre le complexe SMN et l'ARN BC200, si elle s'avère exister *in vivo*, va également dans ce sens.

Malgrè les avancées dans la compréhension de la fonction du complexe SMN, le rôle de la protéine SMN qui est en cause dans la pathologie SMA n'est pas encore connue. La découverte de nouvelles fonctions de la protéine SMN et/ou du complexe SMN devrait permettre de progresser dans la compréhension du rôle de la protéine SMN dans le développement de la maladie. Les résultats que j'ai obtenus durant ma thèse laissent entrevoir deux rôles encore non proposés de la protéine SMN qui, s'il étaient perturbés, pourraient contribuer au développement de la pathologie.

Bibliographie

(1994) Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* **78**(1)**:** 23-33

Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Luhrmann R (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *Embo J* **18**(20)**:** 5789-5802

Adinolfi S, Bagni C, Musco G, Gibson T, Mazzarella L, Pastore A (1999) Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. *RNA* **5**(9)**:** 1248-1258

Adinolfi S, Ramos A, Martin SR, Dal Piaz F, Pucci P, Bardoni B, Mandel JL, Pastore A (2003) The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry* **42**(35)**:** 10437-10444

Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH (1997) Transport and localization element in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* **138**(5)**:** 1077-1087

Alavian CN, Politz JC, Lewandowski LB, Powers CM, Pederson T (2004) Nuclear export of signal recognition particle RNA in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **313**(2)**:** 351-355

Albrecht JC, Fleckenstein B (1992) Nucleotide sequence of HSUR 6 and HSUR 7, two small RNAs of herpesvirus saimiri. *Nucleic Acids Res* **20**(7)**:** 1810

Alioto TS (2007) U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue)**:** D110-115

Althoff S, Selinger D, Wise JA (1994) Molecular evolution of SRP cycle component: functional implications. *Nucleic Acids Res* **22**(11)**:** 1933-1947

Anderson KN, Baban D, Oliver PL, Potter A, Davies KE (2004) Expression profiling in spinal muscular atrophy reveals an RNA binding protein deficit. *Neuromuscul Disord* **14**(11)**:** 711-722

Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coovert DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patient. *Hum Mol Genet* **10**(24)**:** 2841-2849

Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* **12**(1)**:** 59-65

Angelozzi C, Borgo F, Tiziano FD, Martella A, Neri G, Brahe C (2008) Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells. *J Med Genet* **45**(1)**:** 29-31

Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**(11)**:** 2648-2655

Antar LN, Dictenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ (2005) Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* **4**(6)**:** 350-359

Antar LN, Li C, Zhang H, Carroll RC, Bassell GJ (2006) Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci* **32**(1-2)**:** 37-48

Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST (1993a) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**(5133)**:** 563-566

Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST (1993b) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet* **4**(3)**:** 244-251

Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* **117**(3)**:** 659-671

Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND (2004) Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* **114**(12)**:** 1726-1731

Azzouz TN, Gruber A, Schumperli D (2005a) U7 snRNP-specific Lsm11 protein: dual binding contacts with the 100 kDa zinc finger processing factor (ZFP100) and a ZFP100-independent function in histone RNA 3' end processing. *Nucleic Acids Res* **33**(7)**:** 2106-2117

Azzouz TN, Pillai RS, Dapp C, Chari A, Meister G, Kambach C, Fischer U, Schumperli D (2005b) Toward an assembly line for U7 snRNPs: interactions of U7-specific Lsm proteins with PRMT5 and SMN complexes. *J Biol Chem* **280**(41)**:** 34435-34440

Baccon J, Pellizzoni L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* **277**(35)**:** 31957-31962

Bach JR (2007) Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Phys Med Rehabil* **86**(5)**:** 349-355

Bach JR, Vega J, Majors J, Friedman A (2003) Spinal muscular atrophy type 1 quality of life. *Am J Phys Med Rehabil* **82**(2)**:** 137-142

Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie* **84**(8)**:** 775-790

Bagni C, Greenough WT (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* **6**(5)**:** 376-387

Balakin AG, Smith L, Fournier MJ (1996) The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box element with related functions. *Cell* **86**(5)**:** 823-834

Ballarino M, Morlando M, Pagano F, Fatica A, Bozzoni I (2005) The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **25**(13)**:** 5396-5403

Bardoni B, Castets M, Huot ME, Schenck A, Adinolfi S, Corbin F, Pastore A, Khandjian EW, Mandel JL (2003a) 82-FIP, a novel FMRP (fragile X mental retardation protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization. *Hum Mol Genet* **12**(14)**:** 1689-1698

Bardoni B, Davidovic L, Bensaid M, Khandjian EW (2006) The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert Rev Mol Med* **8**(8)**:** 1-16

Bardoni B, Mandel JL (2002) Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev* **12**(3)**:** 284-293

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL (1999) A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum Mol Genet* **8**(13)**:** 2557-2566

Bardoni B, Willemsen R, Weiler IJ, Schenck A, Severijnen LA, Hindelang C, Lalli E, Mandel JL (2003b) NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneurosomes. *Exp Cell Res* **289**(1)**:** 95-107

Barth S, Liss M, Voss MD, Dobner T, Fischer U, Meister G, Grasser FA (2003) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol* **77**(8)**:** 5008-5013

Baserga SJ, Yang XD, Steitz JA (1991) An intact Box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO J* **10**(9)**:** 2645-2651

Battle DJ, Kasim M, Wang J, Dreyfuss G (2007) SMN-independent subunits of the SMN complex. Identification of a small nuclear ribonucleoprotein assembly intermediate. *J Biol Chem* **282**(38)**:** 27953-27959

Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F, Dreyfuss G (2006) The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol Cell* **23**(2)**:** 273-279

Baughan T, Shababi M, Coady TH, Dickson AM, Tullis GE, Lorson CL (2006) Stimulating full-length SMN2 expression by delivering bifunctional RNAs via a viral vector. *Mol Ther* **14**(1)**:** 54-62

Beattie CE, Carrel TL, McWhorter ML (2007) Fishing for a mechanism: using zebrafish to understand spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **22**(8)**:** 995-1003

Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La Bella V, Pettmann B, Triller A (1999) Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* **11**(1)**:** 293-304

Beggs JD (2005) Lsm proteins and RNA processing. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 3)**:** 433-438

Bergemann AD, Johnson EM (1992) The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* **12**(3)**:** 1257-1265

Bergemann AD, Ma ZW, Johnson EM (1992) Sequence of cDNA comprising the human pur gene and sequence-specific single-stranded-DNA-binding properties of the encoded protein. *Mol Cell Biol* **12**(12)**:** 5673-5682

Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**(3)**:** 515-532

Bertrandy S, Burlet P, Clermont O, Huber C, Fondrat C, Thierry-Mieg D, Munnich A, Lefebvre S (1999) The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum Mol Genet* **8**(5)**:** 775-782

Bhuiyan SH, Gowda K, Hotokezaka H, Zwieb C (2000) Assembly of archaeal signal recognition particle from recombinant component. *Nucleic Acids Res* **28**(6)**:** 1365-1373

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* **38**(11 Pt 1)**:** 3751-3757

Birse DE, Kapp U, Strub K, Cusack S, Aberg A (1997) The crystal structure of the signal recognition particle Alu RNA binding heterodimer, SRP9/14. *EMBO J* **16**(13)**:** 3757-3766

Blonden L, van 't Padje S, Severijnen LA, Destree O, Oostra BA, Willemsen R (2005) Two members of the Fxr gene family, Fmr1 and Fxr1, are differentially expressed in Xenopus tropicalis. *Int J Dev Biol* **49**(4)**:** 437-441

Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R (2000) The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* **48**(3)**:** 190-202

Boulon S, Marmier-Gourrier N, Pradet-Balade B, Wurth L, Verheggen C, Jady BE, Rothe B, Pescia C, Robert MC, Kiss T, Bardoni B, Krol A, Branlant C, Allmang C, Bertrand E, Charpentier B (2008) The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. *J Cell Biol* **180**(3)**:** 579-595

Bovia F, Fornallaz M, Leffers H, Strub K (1995) The SRP9/14 subunit of the signal recognition particle (SRP) is present in more than 20-fold excess over SRP in primate cells and exists primarily free but also in complex with small cytoplasmic Alu RNAs. *Mol Biol Cell* **6**(4)**:** 471-484

Bovia F, Strub K (1996) The signal recognition particle and related small cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *J Cell Sci* **109 (Pt 11):** 2601-2608

Bovia F, Wolff N, Ryser S, Strub K (1997) The SRP9/14 subunit of the human signal recognition particle binds to a variety of Alu-like RNAs and with higher affinity than its mouse homolog. *Nucleic Acids Res* **25**(2)**:** 318-326

Bowerman M, Shafey D, Kothary R (2007) Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci* **32**(2)**:** 120-131

Brahe C (2000) Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better. *Neuromuscul Disord* **10**(4-5)**:** 274-275

Brahe C, Clermont O, Zappata S, Tiziano F, Melki J, Neri G (1996) Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum Mol Genet* **5**(12)**:** 1971-1976

Brahe C, Vitali T, Tiziano FD, Angelozzi C, Pinto AM, Borgo F, Moscato U, Bertini E, Mercuri E, Neri G (2005) Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patient. *Eur J Hum Genet* **13**(2)**:** 256-259

Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Luhrmann R (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna* **7**(11)**:** 1531-1542

Brahms H, Raymackers J, Union A, de Keyser F, Meheus L, Luhrmann R (2000) The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem* **275**(22)**:** 17122-17129

Branlant C, Krol A, Ebel JP, Lazar E, Gallinaro H, Jacob M, Sri-Widada J, Jeanteur P (1980) Nucleotide sequences of nuclear U1A RNAs from chicken, rat and man. *Nucleic Acids Res* **8**(18)**:** 4143-4154

Branlant C, Krol A, Ebel JP, Lazar E, Haendler B, Jacob M (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *EMBO J* **1**(10)**:** 1259-1265

Branlant C, Krol A, Lazar E, Haendler B, Jacob M, Galego-Dias L, Pousada C (1983) High evolutionary conservation of the secondary structure and of certain nucleotide sequences of U5 RNA. *Nucleic Acids Res* **11**(23)**:** 8359-8367

Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**(Pt 2)**:** 239-246

Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Puri PL, Gherzi R (2005) p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* **20**(6)**:** 891-903

Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **12**(19)**:** 2481-2489

Briese M, Esmaeili B, Sattelle DB (2005) Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *Bioessays* **27**(9)**:** 946-957

Bromberg MB, Swoboda KJ (2002) Motor unit number estimation in infant and children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* **25**(3)**:** 445-447

Brosius J (1999) RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory element. *Gene* **238**(1)**:** 115-134

Brow DA, Guthrie C (1988) Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature* **334**(6179)**:** 213-218

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**(4)**:** 477-487

Brown V, Small K, Lakkis L, Feng Y, Gunter C, Wilkinson KD, Warren ST (1998) Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* **273**(25)**:** 15521-15527

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* **344**(6266)**:** 540-541

Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **8**(13)**:** 2351-2357

Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**(5172)**:** 615-621

Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* **32**(3)**:** 479-482

Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J (1997) The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* **60**(1)**:** 72-79

Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Burglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M, et al. (1995) A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patient. *Nat Genet* **11**(3)**:** 335-337

Butchbach ME, Edwards JD, Burghes AH (2007) Abnormal motor phenotype in the SMNDelta7 mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* **27**(2)**:** 207-219

Caffarelli E, Fatica A, Prislei S, De Gregorio E, Fragapane P, Bozzoni I (1996) Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J* **15**(5)**:** 1121-1131

Camasses A, Bragado-Nilsson E, Martin R, Seraphin B, Bordonne R (1998) Interactions within the yeast Sm core complex: from proteins to amino acids. *Mol Cell Biol* **18**(4)**:** 1956-1966

Campbell L, Hunter KM, Mohaghegh P, Tinsley JM, Brasch MA, Davies KE (2000) Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum Mol Genet* **9**(7)**:** 1093-1100

Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* **61**(1)**:** 40-50

Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH (2006) Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System. *Annu Rev Neurosci*

Carissimi C, Baccon J, Straccia M, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L (2005) Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett* **579**(11)**:** 2348-2354

Carissimi C, Saieva L, Baccon J, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L (2006a) Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in snRNP assembly. *J Biol Chem*

Carissimi C, Saieva L, Gabanella F, Pellizzoni L (2006b) Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem* **281**(48)**:** 37009-37016

Carlier MF, Didry D, Pantaloni D (1997a) Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophys J* **73**(1)**:** 418-427

Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D (1997b) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* **136**(6)**:** 1307-1322

Carlier MF, Pantaloni D (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**(4)**:** 459-467

Carnegie GK, Sleeman JE, Morrice N, Hastie CJ, Peggie MW, Philp A, Lamond AI, Cohen PT (2003) Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs. *J Cell Sci* **116**(Pt 10)**:** 1905-1913

Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci* **26**(43)**:** 11014-11022

Carson JH, Barbarese E (2005) Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol Cell* **97**(1)**:** 51-62

Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR (2006) Determinant of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* **78**(1)**:** 63-77

Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* **30**(4)**:** 377-384

Cartegni L, Krainer AR (2003) Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* **10**(2)**:** 120-125

Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* **147**(4)**:** 715-728

Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**(19)**:** 2491-2496

Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as component of the complex. *Mol Cell Biol* **19**(12)**:** 7925-7932

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**(24)**:** 3295-3305

Centonze D, Rossi S, Napoli I, Mercaldo V, Lacoux C, Ferrari F, Ciotti MT, De Chiara V, Prosperetti C, Maccarrone M, Fezza F, Calabresi P, Bernardi G, Bagni C (2007) The brain cytoplasmic RNA BC1 regulates dopamine D2 receptor-mediated transmission in the striatum. *J Neurosci* **27**(33)**:** 8885-8892

Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M (2003) Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet* **12**(12)**:** 1367-1376

Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17)**:** 9808-9813

Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol* **147**(6)**:** 1181-1194

Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Yong J, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G (2000) Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol* **148**(6)**:** 1177-1186

Chelly J, Mandel JL (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* **2**(9)**:** 669-680

Chen L, Yun SW, Seto J, Liu W, Toth M (2003) The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience* **120**(4)**:** 1005-1017

Cheng D, Cote J, Shaaban S, Bedford MT (2007) The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol Cell* **25**(1)**:** 71-83

Cheng JG, Tiedge H, Brosius J (1996) Identification and characterization of BC1 RNP particles. *DNA Cell Biol* **15**(7)**:** 549-559

Cheng JG, Tiedge H, Brosius J (1997) Expression of dendritic BC200 RNA, component of a 11.4S ribonucleoprotein particle, is conserved in humans and simians. *Neurosci Lett* **224**(3)**:** 206-210

Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* **292**(1)**:** 13-24

Choi YD, Dreyfuss G (1984a) Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(23)**:** 7471-7475

Choi YD, Dreyfuss G (1984b) Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells. *J Cell Biol* **99**(6)**:** 1997-1204

Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* **152**(5)**:** 1107-1114

Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J (2002) Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* **11**(12)**:** 1439-1447

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18:** 637-706

Claus P, Bruns AF, Grothe C (2004) Fibroblast growth factor-2(23) binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J* **384**(Pt 3)**:** 559-565

Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhlrott J, Kraft T, Grothe C (2003) Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* **278**(1)**:** 479-485

Clemons WM, Jr., Gowda K, Black SD, Zwieb C, Ramakrishnan V (1999) Crystal structure of the conserved subdomain of human protein SRP54M at 2.1 A resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. *J Mol Biol* **292**(3)**:** 697-705

Cleverley RM, Gierasch LM (2002) Mapping the signal sequence-binding site on SRP reveals a significant role for the NG domain. *J Biol Chem* **277**(48)**:** 46763-46768

Coady TH, Shababi M, Tullis GE, Lorson CL (2007) Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing. *Mol Ther* **15**(8)**:** 1471-1478

Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB, Hjelm LN, Kaufmann WE, Warren ST (2008) Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* **146A**(10)**:** 1358-1367

Colledge M, Snyder EM, Crozier RA, Soderling JA, Jin Y, Langeberg LK, Lu H, Bear MF, Scott JD (2003) Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* **40**(3)**:** 595-607

Connolly T, Rapiejko PJ, Gilmore R (1991) Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* **252**(5010)**:** 1171-1173

Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **6**(8)**:** 1205-1214

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW (1997) The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet* **6**(9)**:** 1465-1472

Cornish K, Sudhalter V, Turk J (2004) Attention and language in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **10**(1)**:** 11-16

Cote J, Richard S (2005) Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J Biol Chem* **280**(31)**:** 28476-28483

Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Hameister H, Joos S, Lichter P, Delius H, Poustka A (1995) Highly conserved 3' UTR and expression pattern of FXR1 point to a divergent gene regulation of FXR1 and FMR1. *Hum Mol Genet* **4**(12)**:** 2209-2218

Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL (2001) FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* **3**(5)**:** 359-371

Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for Caenorhabditis elegans in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* **9**(6)**:** 869-877

Cusco I, Barcelo MJ, del Rio E, Baiget M, Tizzano EF (2004) Detection of novel mutations in the SMN Tudor domain in type I SMA patient. *Neurology* **63**(1)**:** 146-149

Cusco I, Lopez E, Soler-Botija C, Jesus Barcelo M, Baiget M, Tizzano EF (2003) A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patient with c.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene. *Hum Mutat* **22**(2)**:** 136-143

Cusin V, Clermont O, Gerard B, Chantereau D, Elion J (2003) Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J Med Genet* **40**(4)**:** e39

DAgata V, Warren ST, Zhao W, Torre ER, Alkon DL, Cavallaro S (2002) Gene expression profiles in a transgenic animal model of fragile X syndrome. *Neurobiol Dis* **10**(3)**:** 211-218

Dahlberg JE, Lund E (1987) Structure and expression of U-snRNA genes. *Mol Biol Rep* **12**(3)**:** 139-143

Dahm R, Kiebler M (2005) Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature* **438**(7067)**:** 432-435

Dahm R, Kiebler M, Macchi P (2007) RNA localisation in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol* **18**(2)**:** 216-223

Dahm R, Macchi P (2007) Human pathologies associated with defective RNA transport and localization in the nervous system. *Biol Cell* **99**(11)**:** 649-661

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB (2005) Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* **19**(8)**:** 903-918

Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**(4)**:** 489-499

Darzacq X, Kittur N, Roy S, Shav-Tal Y, Singer RH, Meier UT (2006) Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J Cell Biol* **173**(2)**:** 207-218

Davidkova G, Carroll RC (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci* **27**(48)**:** 13273-13278

Davidovic L, Huot ME, Khandjian EW (2005) Lost once, the Fragile X Mental Retardation protein is now back onto brain polyribosomes. *RNA Biol* **2**(1)**:** 1-3

Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW (2007) The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* **16**(24)**:** 3047-3058

Davidovic L, Tremblay S, Gravel M, De Koninck P, Khandjian EW (2006) [The fragile X syndrome: one protein missing and 1001 disoriented mRNAs]. *Med Sci (Paris)* **22**(1)**:** 41-46

De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* **3**(1)**:** 31-35

De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R (2002) Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **22**(23)**:** 8332-8341

Denman RB (2002) Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell Mol Biol Lett* **7**(3)**:** 877-883

Denman RB, Dolzhanskaya N, Sung YJ (2004) Regulating a translational regulator: mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. *Cell Mol Life Sci* **61**(14)**:** 1714-1728

Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**(6)**:** 835-845

Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**(4)**:** 545-556

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* **4**(4)**:** 335-340

Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**(5600)**:** 1959-1964

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**(15)**:** 4902-4912

DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res* **7**(4)**:** 339-352

Dolzhanskaya N, Merz G, Aletta JM, Denman RB (2006) Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci* **119**(Pt 9)**:** 1933-1946

Dolzhanskaya N, Sung YJ, Conti J, Currie JR, Denman RB (2003) The fragile X mental retardation protein interacts with U-rich RNAs in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* **305**(2)**:** 434-441

Doran B, Gherbesi N, Hendricks G, Flavell RA, Davis RJ, Gangwani L (2006) Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19)**:** 7471-7475

Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* **9**(2)**:** 180-186

Doudna JA, Batey RT (2004) Structural insights into the signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **73:** 539-557

Duncan R, Bazar L, Michelotti G, Tomonaga T, Krutzsch H, Avigan M, Levens D (1994) A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev* **8**(4)**:** 465-480

Duning K, Buck F, Barnekow A, Kremerskothen J (2008) SYNCRIP, a component of dendritically localized mRNPs, binds to the translation regulator BC200 RNA. *J Neurochem* **105**(2)**:** 351-359

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**(8)**:** 1083-1091

Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory element. *Am J Hum Genet* **64**(5)**:** 1365-1370

Egea PF, Stroud RM, Walter P (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* **15**(2)**:** 213-220

Eggermann T, Eggermann K, Elbracht M, Zerres K, Rudnik-Schoneborn S (2008) A new splice site mutation in the SMN1 gene causes discrepant results in SMN1 deletion screening approaches. *Neuromuscul Disord* **18**(2)**:** 146-149

Eggert C, Chari A, Laggerbauer B, Fischer U (2006) Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* **12**(3)**:** 113-121

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **2**(8)**:** 1147-1153

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL (1994) Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **3**(4)**:** 684-685

Eichler J, Moll R (2001) The signal recognition particle of Archaea. *Trends Microbiol* **9**(3)**:** 130-136

Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* **5**(4)**:** 635-651

Ensser A, Pfinder A, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B (1999) The URNA genes of herpesvirus saimiri (strain C488) are dispensable for transformation of human T cells in vitro. *J Virol* **73**(12)**:** 10551-10555

Eom T, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2003) Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci* **23**(32)**:** 10433-10444

Fan L, Simard LR (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* **11**(14)**:** 1605-1614

Fatica A, Dlakic M, Tollervey D (2002) Naf1 p is a box H/ACA snoRNP assembly factor. *RNA* **8**(12)**:** 1502-1514

Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* **70**(2)**:** 358-368

Feng W, Gubitz AK, Wan L, Battle DJ, Dostie J, Golembe TJ, Dreyfuss G (2005) Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex. *Hum Mol Genet* **14**(12)**:** 1605-1611

Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST (1997) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell* **1**(1)**:** 109-118

Ferrari F, Mercaldo V, Piccoli G, Sala C, Cannata S, Achsel T, Bagni C (2007) The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. *Mol Cell Neurosci*

Ferri A, Melki J, Kato AC (2004) Progressive and selective degeneration of motoneurons in a mouse model of SMA. *Neuroreport* **15**(2)**:** 275-280

Fierro-Monti I, Mohammed S, Matthiesen R, Santoro R, Burns JS, Williams DJ, Proud CG, Kassem M, Jensen ON, Roepstorff P (2006) Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E. *J Proteome Res* **5**(6)**:** 1367-1378

Fischer U, Heinrich J, van Zee K, Fanning E, Luhrmann R (1994) Nuclear transport of U1 snRNP in somatic cells: differences in signal requirement compared with Xenopus laevis oocytes. *J Cell Biol* **125**(5)**:** 971-980

Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**(6)**:** 1023-1029

Fischer U, Luhrmann R (1990) An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science* **249**(4970)**:** 786-790

Flink MT, Atchison WD (2003) Ca2+ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca2+ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr* **35**(6)**:** 697-718

Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH, Jr. (1998) Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11)**:** 6492-6497

Francis MJ, Morrison KE, Campbell L, Grewal PK, Christodoulou Z, Daniels RJ, Monaco AP, Frischauf AM, McPherson J, Wasmuth J, et al. (1993) A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Hum Mol Genet* **2**(8)**:** 1161-1167

Friesen WJ, Dreyfuss G (2000) Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem* **275**(34)**:** 26370-26375

Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G (2001a) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell* **7**(5)**:** 1111-1117

Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van Duyne G, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001b) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol* **21**(24)**:** 8289-8300

Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem* **277**(10)**:** 8243-8247

Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **9**(5)**:** 849-858

Fury MG, Zhang W, Christodoulopoulos I, Zieve GW (1997) Multiple protein: protein interactions between the snRNP common core proteins. *Exp Cell Res* **237**(1)**:** 63-69

Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS ONE* **2**(9)**:** e921

Gabus C, Mazroui R, Tremblay S, Khandjian EW, Darlix JL (2004) The fragile X mental retardation protein has nucleic acid chaperone properties. *Nucleic Acids Res* **32**(7)**:** 2129-2137

Gall JG (2001) A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *FEBS Lett* **498**(2-3)**:** 164-167

Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, Quattrone F, Oliveri RL, Valentino P, Bono F, Aguglia U, Zappia M, Vita G, Quattrone A (1998) Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neurol* **44**(5)**:** 836-839

Gangwani L, Flavell RA, Davis RJ (2005) ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to Cajal bodies. *Mol Cell Biol* **25**(7)**:** 2744-2756

Gangwani L, Mikrut M, Theroux S, Sharma M, Davis RJ (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol* **3**(4)**:** 376-383

Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997a) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**(5)**:** 799-809

Ganot P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1997b) The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence element essential for RNA accumulation. *Genes Dev* **11**(7)**:** 941-956

Garber KB, Visootsak J, Warren ST (2008) Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* **16**(6)**:** 666-672

Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, et al. (1992) Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet* **1**(5)**:** 341-344

Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patient. *Biochem Biophys Res Commun* **213**(1)**:** 342-348

George AL, Jr. (2005) Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* **115**(8)**:** 1990-1999

Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* **274**(53)**:** 37908-37914

Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, et al. (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* **345**(6278)**:** 823-825

Gillian AL, Svaren J (2004) The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* **279**(10)**:** 9056-9063

Gilmore R, Walter P, Blobel G (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **95**(2 Pt 1)**:** 470-477

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68:** 913-963

Girard C, Neel H, Bertrand E, Bordonne R (2006) Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Res* **34**(10)**:** 2925-2932

Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* **23:** 39-71

Golembe TJ, Yong J, Battle DJ, Feng W, Wan L, Dreyfuss G (2005a) Lymphotropic Herpesvirus saimiri uses the SMN complex to assemble Sm cores on its small RNAs. *Mol Cell Biol* **25**(2)**:** 602-611

Golembe TJ, Yong J, Dreyfuss G (2005b) Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs. *Mol Cell Biol* **25**(24)**:** 10989-11004

Gonsalvez GB, Tian L, Ospina JK, Boisvert FM, Lamond AI, Matera AG (2007) Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins. *J Cell Biol* **178**(5)**:** 733-740

Gorodkin J, Knudsen B, Zwieb C, Samuelsson T (2001) SRPDB (Signal Recognition Particle Database). *Nucleic Acids Res* **29**(1)**:** 169-170

Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12)**:** 5547-5551

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1)**:** 59-74

Grimmler M, Otter S, Peter C, Muller F, Chari A, Fischer U (2005) Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Hum Mol Genet* **14**(20)**:** 3099-3111

Grosshans H, Deinert K, Hurt E, Simos G (2001) Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* **153**(4)**:** 745-762

Grossman AW, Elisseou NM, McKinney BC, Greenough WT (2006) Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res* **1084**(1)**:** 158-164

Grunwald DJ, Eisen JS (2002) Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* **3**(9)**:** 717-724

Grzeschik SM, Ganta M, Prior TW, Heavlin WD, Wang CH (2005) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann Neurol* **58**(2)**:** 194-202

Gu W, Pan F, Zhang H, Bassell GJ, Singer RH (2002) A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol* **156**(1)**:** 41-51

Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G (2004) The SMN complex. *Exp Cell Res* **296**(1)**:** 51-56

Gubitz AK, Mourelatos Z, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem* **277**(7)**:** 5631-5636

Guduric-Fuchs J, Mohrlen F, Frohme M, Frank U (2004) A fragile X mental retardation-like gene in a cnidarian. *Gene* **343**(2)**:** 231-238

Gundelfinger ED, Di Carlo M, Zopf D, Melli M (1984) Structure and evolution of the 7SL RNA component of the signal recognition particle. *EMBO J* **3**(10)**:** 2325-2332

Gundelfinger ED, Krause E, Melli M, Dobberstein B (1983) The organization of the 7SL RNA in the signal recognition particle. *Nucleic Acids Res* **11**(21)**:** 7363-7374

Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Roblot N, Joshi V, Melki J (2003) Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* **28**(4)**:** 432-437

Hagerman RJ, Hagerman PJ (2002) The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev* **12**(3)**:** 278-283

Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, Haastert K, Trankle C, Siebzehnrubl FA, Riessland M, Holker I, Claus P, Romstock J, Buslei R, Wirth B, Blumcke I (2006) In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem* **98**(1)**:** 193-202

Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Raschke H, Zerres K, Wirth B (1997) Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patient with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet* **6**(5)**:** 821-825

Hainzl T, Huang S, Sauer-Eriksson AE (2002) Structure of the SRP19 RNA complex and implications for signal recognition particle assembly. *Nature* **417**(6890)**:** 767-771

Hainzl T, Huang S, Sauer-Eriksson AE (2005) Structural insights into SRP RNA: an induced fit mechanism for SRP assembly. *RNA* **11**(7)**:** 1043-1050

Halic M, Beckmann R (2005) The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* **15**(1)**:** 116-125

Hall BJ, Ghosh A (2008) Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci* **31**(2)**:** 82-89

Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* **7**(6)**:** 224

Hamamoto S, Nishitsuji H, Amagasa T, Kannagi M, Masuda T (2006) Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol* **80**(12)**:** 5670-5677

Hamm J, van Santen VL, Spritz RA, Mattaj IW (1988) Loop I of U1 small nuclear RNA is the only essential RNA sequence for binding of specific U1 small nuclear ribonucleoprotein particle proteins. *Mol Cell Biol* **8**(11)**:** 4787-4791

Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4)**:** 557-580

Hann BC, Walter P (1991) The signal recognition particle in S. cerevisiae. *Cell* **67**(1)**:** 131-144

Hao le T, Fuller HR, Lam le T, Le TT, Burghes AH, Morris GE (2007) Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies. *BMC Cell Biol* **8:** 28

Harper JM, Krishnan C, Darman JS, Deshpande DM, Peck S, Shats I, Backovic S, Rothstein JD, Kerr DA (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(18)**:** 7123-7128

Hausmanowa-Petrusewicz I, Askanas W, Badurska B, Emeryk B, Fidzianska A, Garbalinska W, Hetnarska L, Kamieniecka Z, Prot J, Niebroj-Dobosz I, Jedrzejowska H, Sawicka E (1968) Infantile and juvenile spinal muscular atrophy. *J Neurol Sci* **6**(2)**:** 269-287

He XP, Bataille N, Fried HM (1994) Nuclear export of signal recognition particle RNA is a facilitated process that involves the Alu sequence domain. *J Cell Sci* **107 (Pt 4):** 903-912

Hebert MD, Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG (2002) Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell* **3**(3)**:** 329-337

Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Matera AG (2001) Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* **15**(20)**:** 2720-2729

Hedges SB (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**(11)**:** 838-849

Hermann H, Fabrizio P, Raker VA, Foulaki K, Hornig H, Brahms H, Luhrmann R (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J* **14**(9)**:** 2076-2088

Hiley SL, Babak T, Hughes TR (2005) Global analysis of yeast RNA processing identifies new targets of RNase III and uncovers a link between tRNA 5' end processing and tRNA splicing. *Nucleic Acids Res* **33**(9)**:** 3048-3056

Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD (1991) Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **41**(3)**:** 289-294

Hirling H (2008) Endosomal trafficking of AMPA-type glutamate receptors. *Neuroscience*

Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**(5350)**:** 519-526

Hirokawa N (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* **26**(27)**:** 7139-7142

Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* **6**(3)**:** 201-214

Hirose T, Ideue T, Nagai M, Hagiwara M, Shu MD, Steitz JA (2006) A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **23**(5)**:** 673-684

Hirose T, Shu MD, Steitz JA (2003) Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells. *Mol Cell* **12**(1)**:** 113-123

Hirose T, Steitz JA (2001) Position within the host intron is critical for efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23)**:** 12914-12919

Hirtz D, Iannaccone S, Heemskerk J, Gwinn-Hardy K, Moxley R, 3rd, Rowland LP (2005) Challenges and opportunities in clinical trials for spinal muscular atrophy. *Neurology* **65**(9)**:** 1352-1357

Hoek KS, Kidd GJ, Carson JH, Smith R (1998) hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* **37**(19)**:** 7021-7029

Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E (2006) Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* **51**(4)**:** 441-454

Hsu LM, Zagorski J, Fournier MJ (1984) Cloning and sequence analysis of the Escherichia coli 4.5 S RNA gene. *J Mol Biol* **178**(3)**:** 509-531

Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR (2007) Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* **5**(4)**:** e73

Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR (2008) Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* **82**(4)**:** 834-848

Hua Y, Zhou J (2004) Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett* **572**(1-3)**:** 69-74

Huang GM, Jarmolowski A, Struck JC, Fournier MJ (1992) Accumulation of U14 small nuclear RNA in Saccharomyces cerevisiae requires box C, box D, and a 5', 3' terminal stem. *Mol Cell Biol* **12**(10)**:** 4456-4463

Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshallsay C, Wada T, Sekine M, Luhrmann R (1998) Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* **17**(14)**:** 4114-4126

Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11)**:** 7746-7750

Huck L, Scherrer A, Terzi L, Johnson AE, Bernstein HD, Cusack S, Weichenrieder O, Strub K (2004) Conserved tertiary base pairing ensures proper RNA folding and efficient assembly of the signal recognition particle Alu domain. *Nucleic Acids Res* **32**(16)**:** 4915-4924

Hunt SL, Hsuan JJ, Totty N, Jackson RJ (1999) unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev* **13**(4)**:** 437-448

Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dictenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**(7067)**:** 512-515

Iacoangeli A, Rozhdestvensky TS, Dolzhanskaya N, Tournier B, Schutt J, Brosius J, Denman RB, Khandjian EW, Kindler S, Tiedge H (2008) On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(2)**:** 734-739

Iakhiaeva E, Yin J, Zwieb C (2005) Identification of an RNA-binding domain in human SRP72. *J Mol Biol* **345**(4)**:** 659-666

Irwin N, Baekelandt V, Goritchenko L, Benowitz LI (1997) Identification of two proteins that bind to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA. *Nucleic Acids Res* **25**(6)**:** 1281-1288

Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with component of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**(19)**:** 2497-2508

Ivanyi-Nagy R, Davidovic L, Khandjian EW, Darlix JL (2005) Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease. *Cell Mol Life Sci* **62**(13)**:** 1409-1417

Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1995) A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**(6542)**:** 709-712

Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1994) A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**(4)**:** 657-668

Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **10**(5)**:** 497-505

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca2+ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* **179**(1)**:** 139-149

Jablonka S, Wiese S, Sendtner M (2004) Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* **58**(2)**:** 272-286

Jacobson MR, Pederson T (1998) Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14)**:** 7981-7986

Jady BE, Kiss T (2001) A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *Embo J* **20**(3)**:** 541-551

Jaeger JA, Turner DH, Zuker M (1989) Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(20)**:** 7706-7710

Jankowsky E, Fairman ME (2007) RNA helicases--one fold for many functions. *Curr Opin Struct Biol* **17**(3)**:** 316-324

Jarecki J, Chen X, Bernardino A, Coovert DD, Whitney M, Burghes A, Stack J, Pollok BA (2005) Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **14**(14)**:** 2003-2018

Jin P, Alisch RS, Warren ST (2004a) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**(11)**:** 1048-1053

Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K, Warren ST (2004b) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* **7**(2)**:** 113-117

Johnson AE, van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15:** 799-842

Johnson EM, Kinoshita Y, Weinreb DB, Wortman MJ, Simon R, Khalili K, Winckler B, Gordon J (2006) Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J Neurosci Res* **83**(6)**:** 929-943

Jones KW, Gorzynski K, Hales CM, Fischer U, Badbanchi F, Terns RM, Terns MP (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem* **276**(42)**:** 38645-38651

Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* **6**(5)**:** 798-811

Kambach C, Walke S, Young R, Avis JM, de la Fortelle E, Raker VA, Luhrmann R, Li J, Nagai K (1999) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**(3)**:** 375-387

Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**(4)**:** 513-525

Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **34**(4)**:** 460-463

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL (2007) hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet* **16**(24)**:** 3149-3159

Kataoka N, Ohno M, Kangawa K, Tokoro Y, Shimura Y (1994) Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein. *Nucleic Acids Res* **22**(19)**:** 3861-3865

Kataoka N, Ohno M, Moda I, Shimura Y (1995) Identification of the factors that interact with NCBP, an 80 kDa nuclear cap binding protein. *Nucleic Acids Res* **23**(18)**:** 3638-3641

Kaufmann WE, Moser HW (2000) Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* **10**(10)**:** 981-991

Keegstra K, Cline K (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**(4)**:** 557-570

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **70:** 755-775

Keenan RJ, Freymann DM, Walter P, Stroud RM (1998) Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* **94**(2)**:** 181-191

Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ (2005) The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum Mol Genet* **14**(9)**:** 1171-1182

Khanam T, Muddashetty RS, Kahvejian A, Sonenberg N, Brosius J (2006) Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol* **3**(4)**:** 170-177

Khandjian EW (1999) Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein. *Biochem Cell Biol* **77**(4)**:** 331-342

Khandjian EW, Bardoni B, Corbin F, Sittler A, Giroux S, Heitz D, Tremblay S, Pinset C, Montarras D, Rousseau F, Mandel J (1998) Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. *Hum Mol Genet* **7**(13)**:** 2121-2128

Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* **12**(1)**:** 91-93

Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B (2004) Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36)**:** 13357-13362

Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**(1)**:** 19-28

Kim EK, Noh KT, Yoon JH, Cho JH, Yoon KW, Dreyfuss G, Choi EJ (2007) Positive regulation of ASK1-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling pathway by the WD-repeat protein Gemin5. *Cell Death Differ* **14**(8)**:** 1518-1528

Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgins R, Banks LM, Manzur AY, Muntoni F (2002) Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology* **59**(4)**:** 609-610

Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H (2005) RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21:** 223-245

King ML, Messitt TJ, Mowry KL (2005) Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol Cell* **97**(1)**:** 19-33

Kirkpatrick LL, McIlwain KA, Nelson DL (1999) Alternative splicing in the murine and human FXR1 genes. *Genomics* **59**(2)**:** 193-202

Kiss T (2004) Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* **117**(Pt 25)**:** 5949-5951

Kiss T (2006) SnoRNP biogenesis meets Pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **23**(6)**:** 775-776

Klappacher GW, Lunyak VV, Sykes DB, Sawka-Verhelle D, Sage J, Brard G, Ngo SD, Gangadharan D, Jacks T, Kamps MP, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK (2002) An induced Ets repressor complex regulates growth arrest during terminal macrophage differentiation. *Cell* **109**(2)**:** 169-180

Kleyn PW, Gilliam TC (1993) Progress toward cloning of the gene responsible for childhood spinal muscular atrophy. *Semin Neurol* **13**(3)**:** 276-282

Kleyn PW, Wang CH, Lien LL, Vitale E, Pan J, Ross BM, Grunn A, Palmer DA, Warburton D, Brzustowicz LM, et al. (1993) Construction of a yeast artificial chromosome contig spanning the spinal muscular atrophy disease gene region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14)**:** 6801-6805

Kobayashi S, Agui K, Kamo S, Li Y, Anzai K (2000) Neural BC1 RNA associates with pur alpha, a single-stranded DNA and RNA binding protein, which is involved in the transcription of the BC1 RNA gene. *Biochem Biophys Res Commun* **277**(2)**:** 341-347

Kobayashi S, Goto S, Anzai K (1991) Brain-specific small RNA transcript of the identifier sequences is present as a 10 S ribonucleoprotein particle. *J Biol Chem* **266**(8)**:** 4726-4730

Kobayashi S, Takashima A, Anzai K (1998) The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **253**(2)**:** 448-453

Kondrashov AV, Kiefmann M, Ebnet K, Khanam T, Muddashetty RS, Brosius J (2005) Inhibitory effect of naked neural BC1 RNA or BC200 RNA on eukaryotic in vitro translation systems is reversed by poly(A)-binding protein (PABP). *J Mol Biol* **353**(1)**:** 88-103

Kosturko LD, Maggipinto MJ, Korza G, Lee JW, Carson JH, Barbarese E (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Mol Biol Cell* **17**(8)**:** 3521-3533

Kotani T, Sutomo R, Sasongko TH, Sadewa AH, Gunadi, Minato T, Fujii E, Endo S, Lee MJ, Ayaki H, Harada Y, Matsuo M, Nishio H (2007) A novel mutation at the N-terminal of SMN Tudor domain inhibits its interaction with target proteins. *J Neurol* **254**(5)**:** 624-630

Krauer KG, Buck M, Belzer DK, Flanagan J, Chojnowski GM, Sculley TB (2004) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-6 protein co-localizes with EBNA-3 and survival of motor neurons protein. *Virology* **318**(1)**:** 280-294

Krawczun MS, Jenkins EC, Brown WT (1985) Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum Genet* **69**(3)**:** 209-211

Kremerskothen J, Nettermann M, op de Bekke A, Bachmann M, Brosius J (1998a) Identification of human autoantigen La/SS-B as BC1/BC200 RNA-binding protein. *DNA Cell Biol* **17**(9)**:** 751-759

Kremerskothen J, Zopf D, Walter P, Cheng JG, Nettermann M, Niewerth U, Maraia RJ, Brosius J (1998b) Heterodimer SRP9/14 is an integral part of the neural BC200 RNP in primate brain. *Neurosci Lett* **245**(3)**:** 123-126

Krieg UC, Walter P, Johnson AE (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(22)**:** 8604-8608

Krol A, Branlant C, Lazar E, Gallinaro H, Jacob M (1981) Primary and secondary structures of chicken, rat and man nuclear U4 RNAs. Homologies with U1 and U5 RNAs. *Nucleic Acids Res* **9**(12)**:** 2699-2716

Kuglstatter A, Oubridge C, Nagai K (2002) Induced structural changes of 7SL RNA during the assembly of human signal recognition particle. *Nat Struct Biol* **9**(10)**:** 740-744

Kuhn TB, Meberg PJ, Brown MD, Bernstein BW, Minamide LS, Jensen JR, Okada K, Soda EA, Bamburg JR (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol* **44**(2)**:** 126-144

Kunkel GR, Maser RL, Calvet JP, Pederson T (1986) U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci* **83**(22)**:** 8575-8579

Kurzchalia TV, Wiedmann M, Girshovich AS, Bochkareva ES, Bielka H, Rapoport TA (1986) The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* **320**(6063)**:** 634-636

La Bella V, Kallenbach S, Pettmann B (2004) Post-translational modifications in the survival motor neuron protein. *Biochem Biophys Res Commun* **324**(1)**:** 288-293

Labuda D, Zietkiewicz E (1994) Evolution of secondary structure in the family of 7SL-like RNAs. *J Mol Evol* **39**(5)**:** 506-518

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**(4)**:** 329-338

Lai D, Sakkas D, Huang Y (2006) The fragile X mental retardation protein interacts with a distinct mRNA nuclear export factor NXF2. *RNA* **12**(8)**:** 1446-1449

Larsen N, Zwieb C (1991) SRP-RNA sequence alignment and secondary structure. *Nucleic Acids Res* **19**(2)**:** 209-215

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* **14**(6)**:** 845-857

Lee MB, Lebedeva LA, Suzawa M, Wadekar SA, Desclozeaux M, Ingraham HA (2005) The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol* **25**(5)**:** 1879-1890

Lee SI, Murthy SC, Trimble JJ, Desrosiers RC, Steitz JA (1988) Four novel U RNAs are encoded by a herpesvirus. *Cell* **54**(5)**:** 599-607

Lee SI, Steitz JA (1990) Herpesvirus saimiri U RNAs are expressed and assembled into ribonucleoprotein particles in the absence of other viral genes. *J Virol* **64**(8)**:** 3905-3915

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene [see comment]. *Cell* **80**(1)**:** 155-165

Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrandy S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **16**(3)**:** 265-269

Lefebvre S, Burlet P, Viollet L, Bertrandy S, Huber C, Belser C, Munnich A (2002) A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **11**(9)**:** 1017-1027

Lehmeier T, Raker V, Hermann H, Luhrmann R (1994) cDNA cloning of the Sm proteins D2 and D3 from human small nuclear ribonucleoproteins: evidence for a direct D1-D2 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25)**:** 12317-12321

Lemm I, Girard C, Kuhn AN, Watkins NJ, Schneider M, Bordonne R, Luhrmann R (2006) Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Mol Biol Cell* **17**(7)**:** 3221-3231

Lerner EA, Lerner MR, Janeway CA, Jr., Steitz JA (1981) Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituent: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5)**:** 2737-2741

Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J (2003) Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **12**(11)**:** 1233-1239

Leung AK, Nagai K (2005) Gemin 6 and 7 lend a hand to snRNP assembly. *Structure* **13**(6)**:** 833-834

Levine A, Durbin R (2001) A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res* **29**(19)**:** 4006-4013

Lewejohann L, Skryabin BV, Sachser N, Prehn C, Heiduschka P, Thanos S, Jordan U, Dell'Omo G, Vyssotski AL, Pleskacheva MG, Lipp HP, Tiedge H, Brosius J, Prior H (2004) Role of a neuronal small non-messenger RNA: behavioural alterations in BC1 RNA-deleted mice. *Behav Brain Res* **154**(1)**:** 273-289

Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**(11)**:** 2276-2283

Liang WC, Yuo CY, Chang JG, Chen YC, Chang YF, Wang HY, Ju YH, Chiou SS, Jong YJ (2008) The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patient. *J Neurol Sci* **268**(1-2)**:** 87-94

Lim SR, Hertel KJ (2001) Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J Biol Chem* **276**(48)**:** 45476-45483

Lin AC, Holt CE (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J* **26**(16)**:** 3729-3736

Lin D, Pestova TV, Hellen CU, Tiedge H (2008) Translational control by a small RNA: dendritic BC1 RNA targets the eukaryotic initiation factor 4A helicase mechanism. *Mol Cell Biol* **28**(9)**:** 3008-3019

Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J* **15**(14)**:** 3555-3565

Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90**(6)**:** 1013-1021

Lorson CL, Androphy EJ (1998) The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum Mol Genet* **7**(8)**:** 1269-1275

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* **19**(1)**:** 63-66

Lorson MA, Dickson AM, Shaw DJ, Todd AG, Young EC, Morse R, Wolstencroft C, Lorson CL, Young PJ (2008) Identification and characterisation of a nuclear localisation signal in the SMN associated protein, Gemin4. *Biochem Biophys Res Commun* **375**(1)**:** 33-37

Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell W T, Li W, Warren ST, Feng Y (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(42)**:** 15201-15206

Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR (2005) Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem* **94**(4)**:** 896-905

Luirink J, High S, Wood H, Giner A, Tollervey D, Dobberstein B (1992) Signal-sequence recognition by an Escherichia coli ribonucleoprotein complex. *Nature* **359**(6397)**:** 741-743

Luirink J, Sinning I (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3)**:** 17-35

Lund E, Dahlberg JE (1992) Cyclic 2',3'-phosphates and nontemplated nucleotides at the 3' end of spliceosomal U6 small nuclear RNA's. *Science* **255**(5042)**:** 327-330

Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Coovert DD, Burghes AH, Man NT, Morris GE, Zhou J, Androphy EJ, Sumner CJ, Stockwell BR (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem Biol* **11**(11)**:** 1489-1493

Lutcke H (1995) Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur J Biochem* **228**(3)**:** 531-550

Lutcke H, Dobberstein B (1993) Structure and function of signal recognition particle (SRP). *Mol Biol Rep* **18**(2)**:** 143-147

Lutcke H, Prehn S, Ashford AJ, Remus M, Frank R, Dobberstein B (1993) Assembly of the 68- and 72-kD proteins of signal recognition particle with 7S RNA. *J Cell Biol* **121**(5)**:** 977-985

Ma Y, Dostie J, Dreyfuss G, Van Duyne GD (2005) The Gemin6-Gemin7 heterodimer from the survival of motor neurons complex has an Sm protein-like structure. *Structure* **13**(6)**:** 883-892

Madocsai C, Lim SR, Geib T, Lam BJ, Hertel KJ (2005) Correction of SMN2 Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol Ther* **12**(6)**:** 1013-1022

Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, Burghes AH, Prior TW (2002) Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med* **4**(1)**:** 20-26

Maity TS, Leonard CW, Rose MA, Fried HM, Weeks KM (2006) Compartmentalization directs assembly of the signal recognition particle. *Biochemistry* **45**(50)**:** 14955-14964

Makrides SC (1999) Component of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif* **17**(2)**:** 183-202

Maniataki E, Mourelatos Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* **19**(24)**:** 2979-2990

Marmier-Gourrier N, Clery A, Senty-Segault V, Charpentier B, Schlotter F, Leclerc F, Fournier R, Branlant C (2003) A structural, phylogenetic, and functional study of 15.5-kD/Snu13 protein binding on U3 small nucleolar RNA. *RNA* **9**(7)**:** 821-838

Marshallsay C, Luhrmann R (1994) In vitro nuclear import of snRNPs: cytosolic factors mediate m3G-cap dependence of U1 and U2 snRNP transport. *EMBO J* **13**(1)**:** 222-231

Martignetti JA, Brosius J (1993) BC200 RNA: a neural RNA polymerase III product encoded by a monomeric Alu element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24)**:** 11563-11567

Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* **26**(27)**:** 7131-7134

Martin Y, Valero A, del Castillo E, Pascual SI, Hernandez-Chico C (2002) Genetic study of SMA patient without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations. *Hum Genet* **110**(3)**:** 257-263

Massenet S, Mougin A, Branlant C (1998) Posttranscriptional modifications in the U small nuclear RNAs. In *The Modification and Editing of RNA*, Grosjean H, Benne R (eds), pp 201-227. New York: ASM Press

Massenet S, Pellizzoni L, Paushkin S, Mattaj IW, Dreyfuss G (2002) The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol Cell Biol* **22**(18)**:** 6533-6541

Matera AG, Shpargel KB (2006) Pumping RNA: nuclear bodybuilding along the RNP pipeline. *Curr Opin Cell Biol* **18**(3)**:** 317-324

Matera AG, Terns RM, Terns MP (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3)**:** 209-220

Mattaj IW (1986) Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**(6)**:** 905-911

Mattaj IW, De Robertis EM (1985) Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* **40**(1)**:** 111-118

Mattis VB, Rai R, Wang J, Chang CW, Coady T, Lorson CL (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet* **120**(4)**:** 589-601

Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP (2003) The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**(2)**:** 69-74

Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD (1999) Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *Embo J* **18**(15)**:** 4321-4331

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**(24)**:** 3007-3017

McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patient by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* **60**(6)**:** 1411-1422

McKeegan KS, Debieux CM, Boulon S, Bertrand E, Watkins NJ (2007) A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol Cell Biol* **27**(19)**:** 6782-6793

McWhorter ML, Boon KL, Horan ES, Burghes AH, Beattie CE (2008) The SMN binding protein Gemin2 is not involved in motor axon outgrowth. *Dev Neurobiol* **68**(2)**:** 182-194

McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* **162**(5)**:** 919-931

Meister G, Buhler D, Pillai R, lottspeich F, Fisher U (2001a) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nature Cell Biology* **3:** 945-949

Meister G, Eggert C, Buhler D, Brahms H, Kambach C, Fischer U (2001b) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol* **11**(24)**:** 1990-1994

Meister G, Eggert C, Fischer U (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol* **12**(10)**:** 472-478

Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, et al. (1990a) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* **344**(6268)**:** 767-768

Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, et al. (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* **264**(5164)**:** 1474-1477

Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A (1990b) Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* **336**(8710)**:** 271-273

Menichelli E, Isel C, Oubridge C, Nagai K (2007) Protein-induced conformational changes of RNA during the assembly of human signal recognition particle. *J Mol Biol* **367**(1)**:** 187-203

Menon RP, Gibson TJ, Pastore A (2004) The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol* **343**(1)**:** 43-53

Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D'Amico A, Colitto F, Mirabella M, Tiziano FD, Vitali T, Angelozzi C, Kinali M, Main M, Brahe C (2004) Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* **14**(2)**:** 130-135

Mercuri E, Bertini E, Messina S, Solari A, D'Amico A, Angelozzi C, Battini R, Berardinelli A, Boffi P, Bruno C, Cini C, Colitto F, Kinali M, Minetti C, Mongini T, Morandi L, Neri G, Orcesi S, Pane M, Pelliccioni M, Pini A, Tiziano FD, Villanova M, Vita G, Brahe C (2007) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* **68**(1)**:** 51-55

Meyer DI, Dobberstein B (1980) Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **87**(2 Pt 1)**:** 503-508

Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE (1999) The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet* **8**(12)**:** 2133-2143

Miki T, Takano K, Yoneda Y (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct* **30**(2)**:** 51-56

Miller JD, Tajima S, Lauffer L, Walter P (1995) The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **128**(3)**:** 273-282

Miller JD, Wilhelm H, Gierasch L, Gilmore R, Walter P (1993) GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature* **366**(6453)**:** 351-354

Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatment for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(1)**:** 38-51

Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ, Jackson RJ, Willis AE (2003) The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell* **11**(3)**:** 757-771

Miyajima H, Miyaso H, Okumura M, Kurisu J, Imaizumi K (2002) Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing. *J Biol Chem* **277**(26)**:** 23271-23277

Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J (2003) RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron* **37**(3)**:** 417-431

Mizutani A, Fukuda M, Ibata K, Shiraishi Y, Mikoshiba K (2000) SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J Biol Chem* **275**(13)**:** 9823-9831

Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* **48**(6)**:** 885-896

Monani UR, Coovert DD, Burghes AH (2000a) Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **9**(16)**:** 2451-2457

Monani UR, McPherson JD, Burghes AH (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* **1445**(3)**:** 330-336

Monani UR, Pastore MT, Gavrilina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* **160**(1)**:** 41-52

Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000b) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **9**(3)**:** 333-339

Moore MJ, Query CC, Sharp PA (1993) Splicing of precursors to messenger RNAs by the spliceosome. In *The RNA World*, pp 303-357.

Morlando M, Ballarino M, Greco P, Caffarelli E, Dichtl B, Bozzoni I (2004) Coupling between snoRNP assembly and 3' processing controls box C/D snoRNA biosynthesis in yeast. *EMBO J* **23**(12)**:** 2392-2401

Morse R, Shaw DJ, Todd AG, Young PJ (2007) Targeting of SMN to Cajal bodies is mediated by self-association. *Hum Mol Genet* **16**(19)**:** 2349-2358

Mouaikel J, Bujnicki JM, Tazi J, Bordonne R (2003a) Sequence-structure-function relationships of Tgs1, the yeast snRNA/snoRNA cap hypermethylase. *Nucleic Acids Res* **31**(16)**:** 4899-4909

Mouaikel J, Narayanan U, Verheggen C, Matera AG, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R (2003b) Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Rep* **4**(6)**:** 616-622

Mougin A, Gottschalk A, Fabrizio P, Luhrmann R, Branlant C (2002) Direct probing of RNA structure and RNA-protein interactions in purified HeLa cell's and yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles. *J Mol Biol* **317**(5)**:** 631-649

Mount SM, Steitz JA (1981) Sequence of U1 RNA from *Drosophila melanogaster*: implications for U1 secondary structure and possible involvement in splicing. *Nucleic Acids Res* **9**(23)**:** 6351-6368

Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G (2001) SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *Embo J* **20**(19)**:** 5443-5452

Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**(6)**:** 720-728

Muddashetty R, Khanam T, Kondrashov A, Bundman M, Iacoangeli A, Kremerskothen J, Duning K, Barnekow A, Huttenhofer A, Tiedge H, Brosius J (2002) Poly(A)-binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. *J Mol Biol* **321**(3)**:** 433-445

Muddashetty RS, Kelic S, Gross C, Xu M, Bassell GJ (2007) Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* **27**(20)**:** 5338-5348

Muller B, Schumperli D (1997) The U7 snRNP and the hairpin binding protein: Key players in histone mRNA metabolism. *Semin Cell Dev Biol* **8**(6)**:** 567-576

Mullin C, Duning K, Barnekow A, Richter D, Kremerskothen J, Mohr E (2004) Interaction of rat poly(A)-binding protein with poly(A)- and non-poly(A) sequences is preferentially mediated by RNA recognition motifs 3+4. *FEBS Lett* **576**(3)**:** 437-441

Munro TP, Magee RJ, Kidd GJ, Carson JH, Barbarese E, Smith LM, Smith R (1999) Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J Biol Chem* **274**(48)**:** 34389-34395

Munsat TL, Davies KE (1992) International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* **2**(5-6)**:** 423-428

Munsat TL, Skerry L, Korf B, Pober B, Schapira Y, Gascon GG, al-Rajeh SM, Dubowitz V, Davies K, Brzustowicz LM, et al. (1990) Phenotypic heterogeneity of spinal muscular atrophy mapping to chromosome 5q11.2-13.3 (SMA 5q). *Neurology* **40**(12)**:** 1831-1836

Muramatsu T, Ohmae A, Anzai K (1998) BC1 RNA protein particles in mouse brain contain two y-,h-element-binding proteins, translin and a 37 kDa protein. *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1)**:** 7-11

Murthy S, Kamine J, Desrosiers RC (1986) Viral-encoded small RNAs in herpes virus saimiri induced tumors. *EMBO J* **5**(7)**:** 1625-1632

Muslimov IA, Iacoangeli A, Brosius J, Tiedge H (2006) Spatial codes in dendritic BC1 RNA. *J Cell Biol* **175**(3)**:** 427-439

Muslimov IA, Santi E, Homel P, Perini S, Higgins D, Tiedge H (1997) RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. *J Neurosci* **17**(12)**:** 4722-4733

Muslimov IA, Titmus M, Koenig E, Tiedge H (2002) Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci* **22**(11)**:** 4293-4301

Nagai K, Oubridge C, Ito N, Avis J, Evans P (1995) The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends Biochem Sci* **20**(6)**:** 235-240

Nagai K, Oubridge C, Kuglstatter A, Menichelli E, Isel C, Jovine L (2003) Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *EMBO J* **22**(14)**:** 3479-3485

Narayanan U, Achsel T, Luhrmann R, Matera AG (2004) Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol Cell* **16**(2)**:** 223-234

Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Pallas DC, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST (2007) FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci* **27**(52)**:** 14349-14357

Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet* **11**(15)**:** 1785-1795

Nayak MS, Kim YS, Goldman M, Keirstead HS, Kerr DA (2006) Cellular therapies in motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta* **1762**(11-12)**:** 1128-1138

Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z (2004) miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA* **10**(3)**:** 387-394

Neuenkirchen N, Chari A, Fischer U (2008) Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs. *FEBS Lett*

Newitt JA, Bernstein HD (1997) The N-domain of the signal recognition particle 54-kDa subunit promotes efficient signal sequence binding. *Eur J Biochem* **245**(3)**:** 720-729

Nicole S, Desforges B, Millet G, Lesbordes J, Cifuentes-Diaz C, Vertes D, Cao ML, De Backer F, Languille L, Roblot N, Joshi V, Gillis JM, Melki J (2003) Intact satellite cells lead to remarkable protection against Smn gene defect in differentiated skeletal muscle. *J Cell Biol* **161**(3)**:** 571-582

Nicole S, Diaz CC, Frugier T, Melki J (2002) Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* **26**(1)**:** 4-13

Nosyreva ED, Huber KM (2006) Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol* **95**(5)**:** 3291-3295

O'Donnell WT, Warren ST (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* **25:** 315-338

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**(5010)**:** 1097-1102

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, DeLong MR, Olanow CW (2000) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. *Ann Neurol* **47**(4 Suppl 1)**:** S22-32; discussion S32-24

Ogawa C, Usui K, Aoki M, Ito F, Itoh M, Kai C, Kanamori-Katayama M, Hayashizaki Y, Suzuki H (2007) Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* **282**(15)**:** 11122-11134

Ogino S, Wilson RB (2002) Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* **111**(6)**:** 477-500

Ogino S, Wilson RB (2004) Importance of standard nomenclature for SMN1 small intragenic ("subtle") mutations. *Hum Mutat* **23**(4)**:** 392-393

Ohashi S, Kobayashi S, Omori A, Ohara S, Omae A, Muramatsu T, Li Y, Anzai K (2000) The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J Neurochem* **75**(5)**:** 1781-1790

Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* **277**(40)**:** 37804-37810

Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj IW (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**(2)**:** 187-198

Oleynikov Y, Singer RH (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* **13**(3)**:** 199-207

Osugi T, Ding Y, Tanaka H, Kuo CH, Do E, Irie Y, Miki N (1996) Involvement of a single-stranded DNA binding protein, ssCRE-BP/Pur alpha, in morphine dependence. *FEBS Lett* **391**(1-2)**:** 11-16

Otter S, Grimmler M, Neuenkirchen N, Chari A, Sickmann A, Fischer U (2007) A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J Biol Chem* **282**(8)**:** 5825-5833

Ou Q, Mouillet JF, Yan X, Dorn C, Crawford PA, Sadovsky Y (2001) The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* **15**(1)**:** 69-79

Oubridge C, Kuglstatter A, Jovine L, Nagai K (2002) Crystal structure of SRP19 in complex with the S domain of SRP RNA and its implication for the assembly of the signal recognition particle. *Mol Cell* **9**(6)**:** 1251-1261

Owen N, Doe CL, Mellor J, Davies KE (2000) Characterization of the Schizosaccharomyces pombe orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum Mol Genet* **9**(5)**:** 675-684

Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* **9**(1)**:** 47-56

Pakhomova ON, Deep S, Huang Q, Zwieb C, Hinck AP (2002) Solution structure of protein SRP19 of Archaeoglobus fulgidus signal recognition particle. *J Mol Biol* **317**(1)**:** 145-158

Pannone BK, Xue D, Wolin SL (1998) A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *Embo J* **17**(24)**:** 7442-7453

Parano E, Pavone L, Falsaperla R, Trifiletti R, Wang C (1996) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in siblings with spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* **40**(2)**:** 247-251

Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res* **29**(17)**:** 3595-3602

Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1998) Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet* **63**(6)**:** 1712-1723

Parsons DW, McAndrew PE, Monani UR, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1996) An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Hum Mol Genet* **5**(11)**:** 1727-1732

Patel AA, McCarthy M, Steitz JA (2002) The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. *EMBO J* **21**(14)**:** 3804-3815

Patel AA, Steitz JA (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12)**:** 960-970

Paushkin S, Charroux B, Abel L, Perkinson RA, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2000) The survival motor neuron protein of Schizosacharomyces pombe. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J Biol Chem* **275**(31)**:** 23841-23846

Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002) The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**(3)**:** 305-312

Pearn J (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* **15**(6)**:** 409-413

Pearn J (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* **1**(8174)**:** 919-922

Pellizzoni L (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* **8**(4)**:** 340-345

Pellizzoni L, Baccon J, Charroux B, Dreyfuss G (2001a) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol* **11**(14)**:** 1079-1088

Pellizzoni L, Baccon J, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002a) Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem* **277**(9)**:** 7540-7545

Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutant of spinal muscular atrophy patient are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20)**:** 11167-11172

Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001b) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol* **152**(1)**:** 75-85

Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **95**(5)**:** 615-624

Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002b) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* **298**(5599)**:** 1775-1779

Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST (2007) The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8:** 109-129

Peng WT, Robinson MD, Mnaimneh S, Krogan NJ, Cagney G, Morris Q, Davierwala AP, Grigull J, Yang X, Zhang W, Mitsakakis N, Ryan OW, Datta N, Jojic V, Pal C, Canadien V, Richards D, Beattie B, Wu LF, Altschuler SJ, Roweis S, Frey BJ, Emili A, Greenblatt JF, Hughes TR (2003) A panoramic view of yeast noncoding RNA processing. *Cell* **113**(7)**:** 919-933

Pestova TV, Hellen CU (2001) Functions of eukaryotic factors in initiation of translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66:** 389-396

Petri S, Grimmler M, Over S, Fischer U, Gruss OJ (2007) Dephosphorylation of survival motor neurons (SMN) by PPM1G/PP2Cgamma governs Cajal body localization and stability of the SMN complex. *J Cell Biol* **179**(3)**:** 451-465

Pfeifer I, Elsby R, Fernandez M, Faria PA, Nussenzveig DR, Lossos IS, Fontoura BM, Martin WD, Barber GN (2008) NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(11)**:** 4173-4178

Pfeiffer BE, Huber KM (2006) Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci* **26**(27)**:** 7147-7150

Pfeiffer BE, Huber KM (2007) Fragile X mental retardation protein induces synapse loss through acute postsynaptic translational regulation. *J Neurosci* **27**(12)**:** 3120-3130

Piazzon N, Rage F, Schlotter F, Moine H, Branlant C, Massenet S (2008) In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* **283**(9)**:** 5598-5610

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* **66**(4)**:** 817-822

Pillai RS, Grimmler M, Meister G, Will CL, Luhrmann R, Fischer U, Schumperli D (2003) Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev* **17**(18)**:** 2321-2333

Pillai RS, Will CL, Luhrmann R, Schumperli D, Muller B (2001) Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *EMBO J* **20**(19)**:** 5470-5479

Pinol-Roma S, Choi YD, Matunis MJ, Dreyfuss G (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev* **2**(2)**:** 215-227

Plante I, Davidovic L, Ouellet DL, Gobeil LA, Tremblay S, Khandjian EW, Provost P (2006) Dicer-Derived MicroRNAs Are Utilized by the Fragile X Mental Retardation Protein for Assembly on Target RNAs. *J Biomed Biotechnol* **2006**(4)**:** 64347

Plante I, Provost P (2006) Hypothesis: A Role for Fragile X Mental Retardation Protein in Mediating and Relieving MicroRNA-Guided Translational Repression? *J Biomed Biotechnol* **2006**(4)**:** 16806

Politz JC, Lewandowski LB, Pederson T (2002) Signal recognition particle RNA localization within the nucleolus differs from the classical sites of ribosome synthesis. *J Cell Biol* **159**(3)**:** 411-418

Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C, Pederson T (2000) Signal recognition particle component in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1)**:** 55-60

Ponting CP (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**(2)**:** 51-52

Poritz MA, Bernstein HD, Strub K, Zopf D, Wilhelm H, Walter P (1990) An E. coli ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* **250**(4984)**:** 1111-1117

Poritz MA, Strub K, Walter P (1988) Human SRP RNA and E. coli 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. *Cell* **55**(1)**:** 4-6

Price DK, Zhang F, Ashley CT, Jr., Warren ST (1996) The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CCT 5'-untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. *Genomics* **31**(1)**:** 3-12

Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ (2004) Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A* **130A**(3)**:** 307-310

Pu WT, Krapivinsky GB, Krapivinsky L, Clapham DE (1999) pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol Cell Biol* **19**(6)**:** 4113-4120

Qin M, Kang J, Burlin TV, Jiang C, Smith CB (2005) Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse. *J Neurosci* **25**(20)**:** 5087-5095

Qurashi A, Chang S, Peng J (2007) Role of microRNA pathway in mental retardation. *ScientificWorldJournal* **7:** 146-154

Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG (2007) A Drosophila melanogaster model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol* **176**(6)**:** 831-841

Raker VA, Hartmuth K, Kastner B, Luhrmann R (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol* **19**(10)**:** 6554-6565

Raker VA, Plessel G, Luhrmann R (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *Embo J* **15**(9)**:** 2256-2269

Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, Bardoni B, Pastore A (2006) The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. *Structure* **14**(1)**:** 21-31

Rapoport TA, Rolls MM, Jungnickel B (1996) Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol* **8**(4)**:** 499-504

Rehbein M, Wege K, Buck F, Schweizer M, Richter D, Kindler S (2002) Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *J Neurochem* **82**(5)**:** 1039-1046

Renvoise B, Khoobarry K, Gendron MC, Cibert C, Viollet L, Lefebvre S (2006) Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. *J Cell Sci* **119**(Pt 4)**:** 680-692

Richard P, Kiss AM, Darzacq X, Kiss T (2006) Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner. *Mol Cell Biol* **26**(7)**:** 2540-2549

Richard P, Kiss T (2006) Integrating snoRNP assembly with mRNA biogenesis. *EMBO Rep* **7**(6)**:** 590-592

Richter JD (2007) CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci* **32**(6)**:** 279-285

Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet* **120**(1)**:** 101-110

Rinke J, Appel B, Digweed M, Luhrmann R (1985) Localization of a base-paired interaction between small nuclear RNAs U4 and U6 in intact U4/U6 ribonucleoprotein particles by psoralen cross-linking. *J Mol Biol* **185**(4)**:** 721-731

Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet* **108**(3)**:** 255-266

Rochette CF, Surh LC, Ray PN, McAndrew PE, Prior TW, Burghes AH, Vanasse M, Simard LR (1997) Molecular diagnosis of non-deletion SMA patient using quantitative PCR of SMN exon 7. *Neurogenetics* **1**(2)**:** 141-147

Roegiers F, Jan YN (2000) Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons? *Trends Cell Biol* **10**(6)**:** 220-224

Romisch K, Ribes V, High S, Lutcke H, Tollervey D, Dobberstein B (1990) Structure and function of signal recognition particle (SRP). *Mol Biol Rep* **14**(2-3)**:** 71-72

Ronesi JA, Huber KM (2008) Metabotropic glutamate receptors and fragile x mental retardation protein: partners in translational regulation at the synapse. *Sci Signal* **1**(5)**:** pe6

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* **17**(4)**:** 2158-2165

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* **163**(4)**:** 801-812

Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* **11**(1)**:** 93-105

Roy N, McLean MD, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Salih M, Carpten JD, Burghes AH, Yaraghi Z, Ikeda JE, Korneluk RG, et al. (1995) Refined physical map of the spinal muscular atrophy gene (SMA) region at 5q13 based on YAC and cosmid contiguous arrays. *Genomics* **26**(3)**:** 451-460

Rozhdestvensky TS, Kopylov AM, Brosius J, Huttenhofer A (2001) Neuronal BC1 RNA structure: evolutionary conversion of a tRNA(Ala) domain into an extended stem-loop structure. *RNA* **7**(5)**:** 722-730

Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ (2003) A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* **60**(11)**:** 1601-1603

Sachs AB, Varani G (2000) Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* **7**(5)**:** 356-361

Sakla MS, Lorson CL (2008) Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Hum Genet* **122**(6)**:** 635-643

Salazar-Grueso EF, Kim S, Kim H (1991) Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. *Neuroreport* **2**(9)**:** 505-508

Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Seraphin B (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J* **18**(12)**:** 3451-3462

Samuelsson T, Guindy Y (1990) Nucleotide sequence of a Mycoplasma mycoides RNA which is homologous to E. coli 4.5S RNA. *Nucleic Acids Res* **18**(16)**:** 4938

Sanchez-Olea R, Emma F, Coghlan M, Strange K (1998) Characterization of pICln phosphorylation state and a pICln-associated protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1381**(1)**:** 49-60

Sasongko TH, Yusoff S, Lee MJ, Nishioka E, Matsuo M, Nishio H (2008) Hypomutability at the polyadenine tract in SMN intron 3 shows the invariability of the a-SMN protein structure. *Ann Hum Genet* **72**(Pt 2)**:** 288-291

Sauer-Eriksson AE, Hainzl T (2003) S-domain assembly of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1)**:** 64-70

Saunders LR, Perkins DJ, Balachandran S, Michaels R, Ford R, Mayeda A, Barber GN (2001) Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **276**(34)**:** 32300-32312

Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* **20**(17)**:** 4803-4813

Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moine H (2003) The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell* **95**(3-4)**:** 221-228

Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* **20**(1)**:** 83-86

Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A (2003) CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in Drosophila and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* **38**(6)**:** 887-898

Schenck A, Bardoni B, Moro A, Bagni C, Mandel JL (2001) A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15)**:** 8844-8849

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**(5)**:** 695-710

Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M (1997) Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1359**(2)**:** 97-109

Schmid A, DiDonato CJ (2007) Animal models of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **22**(8)**:** 1004-1012

Schrank B, Gotz R, Gunnersen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18)**:** 9920-9925

Schuman EM, Dynes JL, Steward O (2006) Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci* **26**(27)**:** 7143-7146

Schumperli D, Pillai RS (2004) The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20)**:** 2560-2570

Schwartz TU (2007) Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. *Adv Exp Med Biol* **607:** 52-60

Selenko P, Sprangers R, Stier G, Buhler D, Fischer U, Sattler M (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol* **8**(1)**:** 27-31

Seraphin B (1995) Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *Embo J* **14**(9)**:** 2089-2098

Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6)**:** 1959-1964

Shan J, Munro TP, Barbarese E, Carson JH, Smith R (2003) A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci* **23**(26)**:** 8859-8866

Shao Y, Kent SB (1997) Protein splicing: occurrence, mechanisms and related phenomena. *Chem Biol* **4**(3)**:** 187-194

Sharma A, Lambrechts A, Hao le T, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res* **309**(1)**:** 185-197

Shav-Tal Y, Singer RH (2005) RNA localization. *J Cell Sci* **118**(Pt 18)**:** 4077-4081

Sheth N, Roca X, Hastings ML, Roeder T, Krainer AR, Sachidanandam R (2006) Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **34**(14)**:** 3955-3967

Shpargel KB, Matera AG (2005) Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48)**:** 17372-17377

Shtang S, Perry MD, Percy ME (1999) Search for a Caenorhabditis elegans FMR1 homologue: identification of a new putative RNA-binding protein (PRP-1) that hybridizes to the mouse FMR1 double K homology domain. *Am J Med Genet* **84**(3)**:** 283-285

Siegel V, Walter P (1986) Removal of the Alu structural domain from signal recognition particle leaves its protein translocation activity intact. *Nature* **320**(6057)**:** 81-84

Siegel V, Walter P (1988a) Binding sites of the 19-kDa and 68/72-kDa signal recognition particle (SRP) proteins on SRP RNA as determined in protein-RNA "footprinting". *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6)**:** 1801-1805

Siegel V, Walter P (1988b) Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutant of SRP. *Cell* **52**(1)**:** 39-49

Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* **26**(4)**:** 1333-1346

Singh RN (2007) Evolving concepts on human SMN pre-mRNA splicing. *RNA Biol* **4**(1)**:** 7-10

Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1994) Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**(1)**:** 33-39

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**(2)**:** 291-298

Siomi MC, Higashijima K, Ishizuka A, Siomi H (2002) Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol* **22**(24)**:** 8438-8447

Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995) FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J* **14**(11)**:** 2401-2408

Siomi MC, Zhang Y, Siomi H, Dreyfuss G (1996) Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* **16**(7)**:** 3825-3832

Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* **5**(1)**:** 95-102

Skach WR (2007) The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *J Cell Biol* **179**(7)**:** 1333-1335

Skordis LA, Dunckley MG, Burglen L, Campbell L, Talbot K, Patel S, Melki J, Davies KE, Dubowitz V, Muntoni F (2001) Characterisation of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patient with SMA. *Hum Genet* **108**(4)**:** 356-357

Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F (2003) Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7)**:** 4114-4119

Skryabin BV, Sukonina V, Jordan U, Lewejohann L, Sachser N, Muslimov I, Tiedge H, Brosius J (2003) Neuronal untranslated BC1 RNA: targeted gene elimination in mice. *Mol Cell Biol* **23**(18)**:** 6435-6441

Sleeman J (2007) A regulatory role for CRM1 in the multi-directional trafficking of splicing snRNPs in the mammalian nucleus. *J Cell Sci* **120**(Pt 9)**:** 1540-1550

Sommerville J, Brumwell CL, Politz JC, Pederson T (2005) Signal recognition particle assembly in relation to the function of amplified nucleoli of Xenopus oocytes. *J Cell Sci* **118**(Pt 6)**:** 1299-1307

Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C (2001) Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet* **9**(2)**:** 113-120

Sossin WS, DesGroseillers L (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**(12)**:** 1581-1589

Sprangers R, Groves MR, Sinning I, Sattler M (2003) High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J Mol Biol* **327**(2)**:** 507-520

St Johnston D (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(5)**:** 363-375

Stefani G, Fraser CE, Darnell JC, Darnell RB (2004) Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci* **24**(33)**:** 7272-7276

Stetler A, Winograd C, Sayegh J, Cheever A, Patton E, Zhang X, Clarke S, Ceman S (2006) Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp. *Hum Mol Genet* **15**(1)**:** 87-96

Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24:** 299-325

Steward O, Schuman EM (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40**(2)**:** 347-359

Stoyanova V, Rossetti S, L VANU, Oostra BA, Hoogeveen AT (2004) Loss of FMR1 hypermethylation in somatic cell heterokaryons. *FASEB J* **18**(15)**:** 1964-1966

Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1999) Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum Mol Genet* **8**(7)**:** 1219-1226

Strub K, Moss J, Walter P (1991) Binding sites of the 9- and 14-kilodalton heterodimeric protein subunit of the signal recognition particle (SRP) are contained exclusively in the Alu domain of SRP RNA and contain a sequence motif that is conserved in evolution. *Mol Cell Biol* **11**(8)**:** 3949-3959

Strub K, Walter P (1990) Assembly of the Alu domain of the signal recognition particle (SRP): dimerization of the two protein component is required for efficient binding to SRP RNA. *Mol Cell Biol* **10**(2)**:** 777-784

Struck JC, Toschka HY, Specht T, Erdmann VA (1988) Common structural features between eukaryotic 7SL RNAs, eubacterial 4.5S RNA and scRNA and archaebacterial 7S RNA. *Nucleic Acids Res* **16**(15)**:** 7740

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**(1)**:** 113-130

Sulston JE (1983) Neuronal cell lineages in the nematode Caenorhabditis elegans. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 2:** 443-452

Sumner CJ (2006) Therapeutics development for spinal muscular atrophy. *NeuroRx* **3**(2)**:** 235-245

Sumner CJ (2007) Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **22**(8)**:** 979-989

Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coovert DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* **54**(5)**:** 647-654

Sumpter V, Kahrs A, Fischer U, Kornstadt U, Luhrmann R (1992) In vitro reconstitution of U1 and U2 snRNPs from isolated proteins and snRNA. *Mol Biol Rep* **16**(4)**:** 229-240

Sun Y, Grimmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B (2005) Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patient with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat* **25**(1)**:** 64-71

Sung YJ, Dolzhanskaya N, Nolin SL, Brown T, Currie JR, Denman RB (2003) The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *J Biol Chem* **278**(18)**:** 15669-15678

Sutcliffe JG, Milner RJ, Bloom FE, Lerner RA (1982) Common 82-nucleotide sequence unique to brain RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(16)**:** 4942-4946

Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* **127**(1)**:** 49-58

Tadesse H, Deschenes-Furry J, Boisvenue S, Cote J (2008) KH-type splicing regulatory protein interacts with survival motor neuron protein and is misregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **17**(4)**:** 506-524

Tajima S, Lauffer L, Rath VL, Walter P (1986) The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* **103**(4)**:** 1167-1178

Talbot K, Miguel-Aliaga I, Mohaghegh P, Ponting CP, Davies KE (1998) Characterization of a gene encoding survival motor neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum Mol Genet* **7**(13)**:** 2149-2156

Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* **6**(3)**:** 497-500

Tamanini F, Kirkpatrick LL, Schonkeren J, van Unen L, Bontekoe C, Bakker C, Nelson DL, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (2000) The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. *Hum Mol Genet* **9**(10)**:** 1487-1493

Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (1996) FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet* **5**(6)**:** 809-813

Tamanini F, Van Unen L, Bakker C, Sacchi N, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (1999) Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. *Biochem J* **343 Pt 3:** 517-523

Terns MP, Lund E, Dahlberg JE (1992) 3'-end-dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in Xenopus laevis oocyte nuclei. *Mol Cell Biol* **12**(7)**:** 3032-3040

Terns MP, Terns RM (2002) Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr* **10**(1-2)**:** 17-39

Terzi L, Pool MR, Dobberstein B, Strub K (2004) Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. *Biochemistry* **43**(1)**:** 107-117

Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**(5290)**:** 1123-1133

Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L, Keyvan M, Pai G, Mishra R, Haraldsson M, Andresson T, Bragason G, Thosteinsdottir M, Bjornsson JM, Coovert DD, Burghes AH, Gurney ME, Singh J (2008) Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J Med Chem* **51**(3)**:** 449-469

Tiedge H, Chen W, Brosius J (1993a) Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J Neurosci* **13**(6)**:** 2382-2390

Tiedge H, Fremeau RT, Jr., Weinstock PH, Arancio O, Brosius J (1991) Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6)**:** 2093-2097

Tiedge H, Zhou A, Thorn NA, Brosius J (1993b) Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J Neurosci* **13**(10)**:** 4214-4219

Ting CH, Lin CW, Wen SL, Hsieh-Li HM, Li H (2007) Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **16**(5)**:** 499-514

Todd PK, Mack KJ, Malter JS (2003) The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24)**:** 14374-14378

Tollervey D, Kiss T (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **9**(3)**:** 337-342

Tretyakova I, Zolotukhin AS, Tan W, Bear J, Propst F, Ruthel G, Felber BK (2005) Nuclear export factor family protein participates in cytoplasmic mRNA trafficking. *J Biol Chem* **280**(36)**:** 31981-31990

Tsai CH, Jong YJ, Hu CJ, Chen CM, Shih MC, Chang CP, Chang JG (2001) Molecular analysis of SMN, NAIP and P44 genes of SMA patient and their families. *J Neurol Sci* **190**(1-2)**:** 35-40

Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL, Li H (2006) Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* **24**(2)**:** 286-295

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H (1996) Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **64**(1)**:** 196-197

Tycowski KT, You ZH, Graham PJ, Steitz JA (1998) Modification of U6 spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol Cell* **2**(5)**:** 629-638

Ullu E, Esposito V, Melli M (1982a) Evolutionary conservation of the human 7 S RNA sequences. *J Mol Biol* **161**(1)**:** 195-201

Ullu E, Murphy S, Melli M (1982b) Human 7SL RNA consists of a 140 nucleotide middle-repetitive sequence inserted in an alu sequence. *Cell* **29**(1)**:** 195-202

Ullu E, Tschudi C (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* **312**(5990)**:** 171-172

Van 't Padje S, Engels B, Blonden L, Severijnen LA, Verheijen F, Oostra BA, Willemsen R (2005) Characterisation of Fmrp in zebrafish: evolutionary dynamics of the fmr1 gene. *Dev Genes Evol* **215**(4)**:** 198-206

van Bergeijk J, Haastert K, Grothe C, Claus P (2006) Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem Biol Drug Des* **67**(3)**:** 244-247

van Bergeijk J, Rydel-Konecke K, Grothe C, Claus P (2007) The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus. *FASEB J* **21**(7)**:** 1492-1502

van Koningsbruggen S, Straasheijm KR, Sterrenburg E, de Graaf N, Dauwerse HG, Frant RR, van der Maarel SM (2007) FRG1P-mediated aggregation of proteins involved in pre-mRNA processing. *Chromosoma* **116**(1)**:** 53-64

Verheggen C, Lafontaine DL, Samarsky D, Mouaikel J, Blanchard JM, Bordonne R, Bertrand E (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartment. *EMBO J* **21**(11)**:** 2736-2745

Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**(6431)**:** 722-724

Verkerk AJ, de Graaff E, De Boulle K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, et al. (1993) Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* **2**(4)**:** 399-404

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**(5)**:** 905-914

Villace P, Marion RM, Ortin J (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**(8)**:** 2411-2420

Vincent A, Lang B, Kleopa KA (2006) Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* **52**(1)**:** 123-138

Viollet L, Bertrandy S, Bueno Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guenet JL, Munnich A, Melki J (1997) cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). *Genomics* **40**(1)**:** 185-188

Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-Veber P, Bonnefont JP, Melki J (2007) Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol* **171**(4)**:** 1269-1280

Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, Tronche F, Vadrot J, Moreau MH, Kemeny F, Melki J (2004) Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am J Pathol* **165**(5)**:** 1731-1741

von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**(1)**:** 99-105

Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, Fuentes JL, Pellizzoni L, Matera AG (2008) The SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet*

Walter P, Blobel G (1983a) Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell* **34**(2)**:** 525-533

Walter P, Blobel G (1983b) Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. *J Cell Biol* **97**(6)**:** 1693-1699

Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitz AK, Kolb SJ, Wang J, Dreyfuss G (2005) The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol* **25**(13)**:** 5543-5551

Wan L, Dockendorff TC, Jongens TA, Dreyfuss G (2000) Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol Cell Biol* **20**(22)**:** 8536-8547

Wang CH, Carter TA, Das K, Xu J, Ross BM, Penchaszadeh GK, Gilliam TC (1997) Extensive DNA deletion associated with severe disease alleles on spinal muscular atrophy homologues. *Ann Neurol* **42**(1)**:** 41-49

Wang H, Dictenberg JB, Ku L, Li W, Bassell GJ, Feng Y (2008) Dynamic Association of the Fragile X Mental Retardation Protein as a Messenger Ribonucleoprotein between Microtubules and Polyribosomes. *Mol Biol Cell* **19**(1)**:** 105-114

Wang H, Iacoangeli A, Lin D, Williams K, Denman RB, Hellen CU, Tiedge H (2005) Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J Cell Biol* **171**(5)**:** 811-821

Wang H, Iacoangeli A, Popp S, Muslimov IA, Imataka H, Sonenberg N, Lomakin IB, Tiedge H (2002) Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. *J Neurosci* **22**(23)**:** 10232-10241

Wang H, Ku L, Osterhout DJ, Li W, Ahmadian A, Liang Z, Feng Y (2004) Developmentally-programmed FMRP expression in oligodendrocytes: a potential role of FMRP in regulating translation in oligodendroglia progenitors. *Hum Mol Genet* **13**(1)**:** 79-89

Wang J, Dreyfuss G (2001) Characterization of functional domains of the SMN protein in vivo. *J Biol Chem* **276**(48)**:** 45387-45393

Wassarman DA, Lee SI, Steitz JA (1989) Nucleotide sequence of HSUR 5 RNA from herpesvirus saimiri. *Nucleic Acids Res* **17**(3)**:** 1258

Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, Luhrmann R (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell* **16**(5)**:** 789-798

Watkins NJ, Leverette RD, Xia L, Andrews MT, Maxwell ES (1996) Element essential for processing intronic U14 snoRNA are located at the termini of the mature snoRNA sequence and include conserved nucleotide boxes C and D. *RNA* **2**(2)**:** 118-133

Watkins NJ, Segault V, Charpentier B, Nottrott S, Fabrizio P, Bachi A, Wilm M, Rosbash M, Branlant C, Luhrmann R (2000) A common core RNP structure shared between the small nucleoar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* **103**(3)**:** 457-466

Watson JB, Sutcliffe JG (1987) Primate brain-specific cytoplasmic transcript of the Alu repeat family. *Mol Cell Biol* **7**(9)**:** 3324-3327

Wehner KA, Ayala L, Kim Y, Young PJ, Hosler BA, Lorson CL, Baserga SJ, Francis JW (2002) Survival motor neuron protein in the nucleolus of mammalian neurons. *Brain Res* **945**(2)**:** 160-173

Weichenrieder O, Kapp U, Cusack S, Strub K (1997) Identification of a minimal Alu RNA folding domain that specifically binds SRP9/14. *RNA* **3**(11)**:** 1262-1274

Weichenrieder O, Stehlin C, Kapp U, Birse DE, Timmins PA, Strub K, Cusack S (2001) Hierarchical assembly of the Alu domain of the mammalian signal recognition particle. *RNA* **7**(5)**:** 731-740

Weichenrieder O, Wild K, Strub K, Cusack S (2000) Structure and assembly of the Alu domain of the mammalian signal recognition particle. *Nature* **408**(6809)**:** 167-173

Weihl CC, Connolly AM, Pestronk A (2006) Valproate may improve strength and function in patient with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology* **67**(3)**:** 500-501

Weiler IJ, Irwin SA, Klintova 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**(10)**:** 5395-5400

Weiler IJ, Spangler CC, Klintova 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**(50)**:** 17504-17509

West N, Roy-Engel AM, Imataka H, Sonenberg N, Deininger P (2002) Shared protein component of SINE RNPs. *J Mol Biol* **321**(3)**:** 423-432

Westmark CJ, Malter JS (2007) FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol* **5**(3)**:** e52

Whitehead SE, Jones KW, Zhang X, Cheng X, Terns RM, Terns MP (2002) Determinant of the interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the dimethylarginine-modified box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein GAR1. *J Biol Chem* **277**(50)**:** 48087-48093

Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R (2004a) SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11)**:** 1049-1053

Wild K, Rosendal KR, Sinning I (2004b) A structural step into the SRP cycle. *Mol Microbiol* **53**(2)**:** 357-363

Wild K, Sinning I, Cusack S (2001) Crystal structure of an early protein-RNA assembly complex of the signal recognition particle. *Science* **294**(5542)**:** 598-601

Wild K, Weichenrieder O, Strub K, Sinning I, Cusack S (2002) Towards the structure of the mammalian signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* **12**(1)**:** 72-81

Wilgenbus KK, Coy JF, Mincheva A, Nicolai H, Solomon E, Lichter P, Poustka A (1996) Ordering of 66 STSs along the entire short arm of human chromosome 17 and chromosome assignment of a transcribed sequence (FMR1L2) homologous to FMR1. *Cytogenet Cell Genet* **73**(3)**:** 240-243

Will CL, Luhrmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3)**:** 290-301

Willemsen R, Bontekoe C, Tamanini F, Galjaard H, Hoogeveen A, Oostra B (1996) Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun* **225**(1)**:** 27-33

Williams BY, Hamilton SL, Sarkar HK (2000) The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain. *FEBS Lett* **470**(2)**:** 207-210

Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggerbauer B, Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* **19**(19)**:** 2320-2330

Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* **15**(3)**:** 228-237

Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006a) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol* **13**(2)**:** 121-131

Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A, Heller R (2006b) Mildly affected patient with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* **119**(4)**:** 422-428

Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patient with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* **64**(5)**:** 1340-1356

Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Muller-Myhsok B, Schonling J, Zerres K (1997) De novo rearrangement found in 2% of index patient with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* **61**(5)**:** 1102-1111

Wohrle D, Kotzot D, Hirst MC, Manca A, Korn B, Schmidt A, Barbi G, Rott HD, Poustka A, Davies KE, et al. (1992) A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-I gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* **51**(2)**:** 299-306

Wolin SL, Cedervall T (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem* **71:** 375-403

Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL (2005) A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum Mol Genet* **14**(9)**:** 1199-1210

Wood M, Yin H, McClorey G (2007) Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* **3**(6)**:** e109

Wu Q, Krainer AR (1999) AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol* **19**(5)**:** 3225-3236

Xu H, Pillai RS, Azzouz TN, Shpargel KB, Kambach C, Hebert MD, Schumperli D, Matera AG (2005a) The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma* **114**(3)**:** 155-166

Xu H, Somers ZB, Robinson ML, 2nd, Hebert MD (2005b) Tim50a, a nuclear isoform of the mitochondrial Tim50, interacts with proteins involved in snRNP biogenesis. *BMC Cell Biol* **6**(1)**:** 29

Yang PK, Hoareau C, Froment C, Monsarrat B, Henry Y, Chanfreau G (2005) Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly. *Mol Cell Biol* **25**(8)**:** 3295-3304

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1)**:** 103-119

Yin J, Iakhiaeva E, Menichelli E, Zwieb C (2007) Identification of the RNA binding regions of SRP68/72 and SRP72 by systematic mutagenesis of human SRP RNA. *RNA Biol* **4**(3)**:** 154-159

Yin J, Yang CH, Zwieb C (2004) Two strategically placed base pairs in helix 8 of mammalian signal recognition particle RNA are crucial for the SPR19-dependent binding of protein SRP54. *RNA* **10**(4)**:** 574-580

Yong J, Golembe TJ, Battle DJ, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2004a) snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol Cell Biol* **24**(7)**:** 2747-2756

Yong J, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2002) Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *Embo J* **21**(5)**:** 1188-1196

Yong J, Wan L, Dreyfuss G (2004b) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol* **14**(5)**:** 226-232

Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL (2002a) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J Biol Chem* **277**(4)**:** 2852-2859

Young PJ, Francis JW, Lince D, Coon K, Androphy EJ, Lorson CL (2003) The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein. *Brain Res Mol Brain Res* **119**(1)**:** 37-49

Young PJ, Jensen KT, Burger LR, Pintel DJ, Lorson CL (2002b) Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection. *J Virol* **76**(8)**:** 3892-3904

Young PJ, Jensen KT, Burger LR, Pintel DJ, Lorson CL (2002c) Minute virus of mice small nonstructural protein NS2 interacts and colocalizes with the Smn protein. *J Virol* **76**(12)**:** 6364-6369

Young PJ, Le TT, Dunckley M, Nguyen TM, Burghes AH, Morris GE (2001) Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res* **265**(2)**:** 252-261

Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE (2000) The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet* **9**(19)**:** 2869-2877

Yu YT, Shu MD, Steitz JA (1998) Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *Embo J* **17**(19)**:** 5783-5795

Yuo CY, Lin HH, Chang YS, Yang WK, Chang JG (2008) 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride enhances SMN2 exon 7 inclusion and protein expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann Neurol* **63**(1)**:** 26-34

Zalfa F, Achsel T, Bagni C (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**(3)**:** 265-269

Zalfa F, Adinolfi S, Napoli I, Kuhn-Holsken E, Urlaub H, Achsel T, Pastore A, Bagni C (2005) FMRP binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA binding motif. *J Biol Chem*

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**(5)**:** 578-587

Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**(3)**:** 317-327

Zarnescu DC, Jin P, Betschinger J, Nakamoto M, Wang Y, Dockendorff TC, Feng Y, Jongens TA, Sisson JC, Knoblich JA, Warren ST, Moses K (2005) Fragile X protein functions with lgl and the par complex in flies and mice. *Dev Cell* **8**(1)**:** 43-52

Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* **26**(33)**:** 8622-8632

Zhang H, Xing L, Singer RH, Bassell GJ (2007) QNQKE targeting motif for the SMN-Gemin multiprotein complexin neurons. *J Neurosci Res* **85**(12)**:** 2657-2667

Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* **23**(16)**:** 6627-6637

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**(21)**:** 5358-5366

Zhang Z, Harris D, Pandey VN (2008a) The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. *J Virol* **82**(12)**:** 5761-5773

Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008b) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* **133**(4)**:** 585-600

Zopf D, Bernstein HD, Johnson AE, Walter P (1990) The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J* **9**(13)**:** 4511-4517

Zou J, Barahmand-pour F, Blackburn ML, Matsui Y, Chansky HA, Yang L (2004) Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A. *J Biol Chem* **279**(15)**:** 14922-14928

Zou K, Liu J, Zhu N, Lin J, Liang Q, Brown WT, Shen Y, Zhong N (2007) Identification of FMRP-associated mRNAs using yeast three-hybrid system. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*

Zwieb C (1985) The secondary structure of the 7SL RNA in the signal recognition particle: functional implications. *Nucleic Acids Res* **13**(17)**:** 6105-6124

Zwieb C, Eichler J (2002) Getting on target: the archaeal signal recognition particle. *Archaea* **1**(1)**:** 27-34

Zwieb C, Larsen N (1997) The Signal Recognition Particle Database (SRPDB). *Nucleic Acids Res* **25**(1)**:** 107-108

Zwieb C, Muller F, Larsen N (1996) Comparative analysis of tertiary structure element in signal recognition particle RNA. *Fold Des* **1**(4)**:** 315-324

Résumé en français

L'amyotrophie spinale (SMA) est causée par une réduction du taux de la protéine de Survie des MotoNeurones (SMN). Cette protéine est associée aux protéines Gemin 2 à Gemin 8 et unrip pour former le complexe SMN. Bien que la protéine SMN soit présente dans tous les types cellulaires, la pathologie SMA est exclusivement liée à un défaut des motoneurones. Récemment, il a été proposé que SMN puisse avoir des fonctions spécifiques dans le transport des ARNm et dans la régulation de la traduction dans les neurones. La protéine FMRP, défective dans le syndrome de l'X fragile, joue également un rôle dans le transport de particules messagères (mRNP) et dans leur traduction. Dans cette étude, nous avons mis en évidence un lien entre le complexe SMN et la protéine FMRP dans les cellules neuronales suggérant un rôle du complexe SMN dans ces mécanismes. Les connaissances sur la composition, les interactions et les fonctions du complexe SMN ont bien avancées ces dernières années. L'idée actuelle est que le complexe SMN agirait comme un chaperon macromoléculaire des RNP en augmentant l'efficacité et la fidélité des interactions ARN-protéines et en fournissant l'opportunité à ces interactions d'être régulées. Le deuxième volet de cette étude a été d'analyser l'implication du complexe SMN dans l'assemblage de RNP différentes des UsnRNP. Le défaut spécifique des motoneurones nous a conduit à considérer le rôle du complexe SMN dans l'assemblage de RNP spécifiques à ce type cellulaire et notamment la RNP BC200. Finalement, nous nous sommes également intéressé à l'implication du complexe SMN dans l'assemblage et/ou la fonction de la particule SRP, une particule ubiquitaire.

Titre en anglais

Function of the Survival of Motor Neuron (SMN) complex in the biogenesis of RNA/protein particles

Résumé en anglais

Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by reduced levels of the survival of motor neuron (SMN) protein. SMN protein is associated with the proteins Gemin 2 to 8 and unrip to form the SMN complex. Although the SMN protein is present in all cell types, SMA is restricted to a defect in motor neuron. SMN was recently proposed to have specific functions in mRNA transport and translation regulation in neuronal processes. The defective protein in Fragile X mental retardation syndrome (FMRP) also plays a role in transport of mRNPs and in their translation. In this study, we showed a link between the SMN complex and FMRP in neuronal cells suggesting a role for the SMN complex in these processes. Knowledges of the composition, interactions and functions of the SMN complex have advanced greatly in recent years. The emerging picture is that the SMN complex acts as a macromolecular chaperone of RNPs to increase the efficiency and fidelity of RNA–protein interactions, and to provide an opportunity for these interactions to be regulated. The second part of this study was to analyse the involvement of the SMN complex in the biogenesis of RNP different of UsnRNP. The specific defect of motor neuron led us to analyse the role of the SMN complex in the biogenesis of specific RNP to this cell types in particular the RNP BC200. Finally, we are also interested to the SMN complex involvement in the assembly and/or the function of the SRP particle, an ubiquitous particle.

Mots clés

Complexe SMN, Amyotrophie spinale, FMRP, particule SRP, ARN BC200, interactions ARN-protéines

Discipline-spécialité doctorale

Biologie moléculaire et cellulaire