

Université Louis Pasteur, Strasbourg 1 École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé Institut de génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire



THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline: Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Marie-Cécile Didiot

Bases moléculaires du syndrome de l'X fragile : Étude de l'implication de la protéine FMRP dans le métabolisme des ARN messagers.

Thèse soutenue publiquement le 10 octobre 2008 devant la commission d'examen :

Monsieur le Prof. Jean-Louis Mandel

Monsieur le Dr Hervé Moine

Madame le Dr Catherine Tomasetto

Madame le Dr Christiane Branlant

Monsieur le Dr Stéphane Vagner

Madame le Dr Barbara Bardoni

Président du jury

Directeur de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Examinateur

Remerciements

Ce travail a bénéficié du soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, de l'Université Louis Pasteur et de l'Association pour la Recherche contre le Cancer.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : les Docteurs Christiane Branlant, Catherine Tomasetto, Barbara Bardoni, et Stéphane Vagner, et le Professeur Jean-Louis Mandel.

Je voudrais exprimer mes plus profonds remerciements à Hervé Moine qui m'a encadrée durant ces quatre années de thèse et mon stage de Master 2. Merci pour nos nombreuses discussions scientifiques particulièrement enrichissantes et pour tous les conseils, toujours très judicieux, que tu m'as donnés. Merci également pour ta disponibilité, la patience dont tu as fait preuve vis à vis de nos résultats très souvent déconcertants et pour la grande confiance et l'attention que tu m'as accordées.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Jean-Louis Mandel pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour votre compétence scientifique et votre disponibilité.

Merci Xia, et Murugan, Eric et Anne-Catherine pour le travail que nous avons réalisé ensemble. Un grand merci à Solange, notre "nounou des souris", pour tout l'aide que tu m'as apporté en t'occupant des souris et de leur génotypage.

Merci Barbara et Elias pour le travail réalisé en étroite collaboration sur la SOD1.

A tous les membres de l'équipe JLM avec lesquels j'ai travaillé ou que j'ai pu croiser, pour vos conseils lors de nos réunions, merci : Marie C., Marie W., Alain, Stéphane, Soumya, Frédéric, Estelle, Nadège C., Nadège, Laurence, Hélène, Mirna, Clothilde, Nathalie, Michel, Myriam, Marina, Gretta, Carine, Karine, Agathy, Aurélien, Chantal, Yvon, André, Aline, Anne T., Valérie, Johan, Karim, Holger, Anne-So, Cricri, Lama, Anna, Thiebaut "Padawan", Belinda, Jocelyn, Soraya, Virginie et tous ceux que j'ai oublié. Un grand merci à la plupart d'entre vous d'avoir facilité mon changement d'institut. Je souhaite remercier tous les gens de l'IGBMC que j'ai rencontré Natacha, Nathalie, charlotte, Robin, MacLean, Axelle, Aurélie, Christina, et tous les autres.

Merci aux services communs de l'IGBMC, en particulier aux services de culture cellulaire et de microscopie, qui participent à la facilitation et la réussite de tous nos travaux. Et surtout, merci à Maité, "sage-femme" des thésards, pour l'aide précieuse qu'elle apporte lorsque vient le moment fatidique de l'impression du manuscrit.

Merci à tous les membres de l'UPR9002, en particulier ceux de l'équipe Ehresmann, avec lesquels j'ai commencé ce travail de thèse et passé certains des meilleurs moments de ces cinq dernières années : Bernard, Chantal, Guigui, Eric H., Céline, Tom, Pascale, Flore, Delphine, Gaëlle, Simon, Pierre, Maria, Valérie G., Serena, Stefano, Angélita, Mélanie, Marie-Aline, Mathieu, Béné, Micki, Marco, cousin Hub', Philippe D. et Philippe W., Yazan, Catherine, Valérie, Inès, Chantal et Bernard, Roland, Monique, Luc, Elodie, Magalie,.... JCp32, merci pour tout. Fabrice, merci pour ton coup de pouce. Comme quoi, le réseau, ça marche et see you soon in Novartis.

Merci aux fifilles, Fredo, Anne "LaBlonde" et Sabine pour nos repas animés de divagations toutes plus scientifiques les une que les autres. Nos niaiseries et nos discussions "people-fringues" vont me manquer. J'espère que vous continuerez à faire les concierges par mail quand je ne serai plus à l'institut.

Patricia et Dorra, votre présence, votre chaleur et toutes nos conversations ont été d'un grand réconfort pendant ces années.

Ma p'tite Sabrinette que dire de tous nos fous rires à la fac, surtout les fous rires Tipol grâce auxquels j'ai pu faire des abdos sans faire de sport. See you in Basel. Je te serai toujours reconnaissante d'avoir rendu les cours et les TP aussi "attractifs" et intéressants.

Merci à toi Jérémie pour toutes nos soirées "anti-stress", elles ont participé à rendre ces années d'étude plus agréables. Je prendrai grand soin de la santé de mon futur pensionnaire afin de ne jamais les oublier.

Copine Eva K., je te remercie pour toutes les discussions "bla-bla" qui soulagent. Ton amitié et ton écoute ont été une aide précieuse tout au long de cette thèse. Et, pendant au moins les trois prochaines années, tu sauras où me trouver pour aller se régaler avec un bon "onglet de bœuf aux girolles fraîches"...

« Good friends are like stars. You don't always see them but you know they are there ».

Je voudrais avoir une énorme pensée pour mes grands-parents qui, j'en suis sûre, auraient été très fiers et heureux de voir aboutir ce travail de tant d'années.

Je vous remercie, Laurent, Gaspard, Anne-Laure, Robert, Caroline, Nicole, Antoinette et Alphonse pour tous les moments de détente et de joie passés avec vous.

Un merci particulier à Mr Jean-Pierre A. Le guide montre la voie ; nous sommes arrivés à un carrefour, mais le chemin est encore long.

Je te remercie mon amour, mon Loulou, d'avoir supporté mes angoisses et mes complaintes pendant ces cinq années. Ta présence, ton écoute attentive, tes paroles rassurantes, ta sérénité (... la liste est encore longue !!!) et surtout ton Amour ont été pour moi un soutien permanent et m'ont permis de relativiser à chaque instant. Tu m'as permis de garder l'équilibre et de retrouver la volonté perdue lors des périodes d'incertitude. MERCI.

Enfin, à vous mes parents, les mots me manquent afin d'exprimer la reconnaissance infinie que j'ai à votre égard. Ce parcours n'aurait pas été possible sans le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ces années, le respect dont vous avez fait preuve envers mes choix et votre réconfort lors des moments de doute. Tout cela n'a pas de prix. MERCI.

La Science n'est pas une illusion. Mais il serait une illusion de croire que nous pouvons trouver ailleurs ce qu'elle ne peut nous donner.

Sigmund Freud

A mes Parents

TABLE DES MATIERES	7
ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	18
I. LE SYNDROME DE L'X FRAGILE :	
DECOUVERTE, CARACTERISATIONS CLINIQUE ET GENETIQUE	18
1. Les retards mentaux	18
1.1) Définition et diagnostic des retards mentaux	18
1.2) La prévalence et les causes des retards mentaux	18
1.3) La classification des retards mentaux liés au chromosome X	19
2. IDENTIFICATION D'UN SITE FRAGILE COMME MARQUEUR CHROMOSOMIQUE D'UN RETARD MENTAL LIE	A
L'X : LE SYNDROME DE L'X FRAGILE	20
3. CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DU SYNDROME DE L'X FRAGILE	21
3.1) Tableau clinique	21
a) Les troubles cognitifs	21
b) Les troubles comportementaux	21
c) Autres troubles	22
3.2) Les caractéristiques anatomopathologiques cérébrales	23
a) A l'échelle anatomique	
b) A l'échelle cellulaire : les épines dendritiques	
c) Les variabilités phénotypiques et la prévalence du syndrome	
4. LES CAUSES GENETIQUES DU SYNDROME DE L'X FRAGILE	
4.1) Le gène Fmr1	
4.2) Les mutations du gène Fmr1	
a) Le syndrome de l'X fragile, une maladie à expansion de triplets nucléotidiques	
b) Autres mutations	28
II. LA PROTEINE FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN, FMRP	28
1. Expression de la proteine FMRP	28
2. FMRP : UNE PROTEINE AUX DIFFERENTES ISOFORMES	29
3. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE FMRP	29
3.1) Le domaine de phosphorylation	29
3.2) FMRP est une protéine méthylée	31
4. LES DOMAINES FONCTIONNELS DE FMRP	32
4.1) FMRP, protéine navette entre le noyau et le cytoplasme	32
a) Le NES	32
b) Le NLS	
4.2) FMRP et ses domaines de liaison à l'ARN	33
a) Les domaines KH	33

b) La boîte RGG	34
4.3) Les domaines d'interaction protéine-protéine	34
a) Le domaine NDF	34
b) L'exon 7	35
5. LES DIFFERENTS INTERACTEURS DE FMRP	35
5.1) FMRP, une protéine de liaison à l'ARN	35
a) Mise en évidence	35
b) Les motifs ARN reconnus par FMRP	36
5.2) Les principaux interacteurs protéiques de FMRP	38
a) FXR1P et FXR2P	38
b) 82-FIP, NUFIP, CYFIP1/2, Nucléoline,	39
c) Les protéines de la voie d'ARN interférence	
6. ROLES POTENTIELS DE FMRP	41
6.1) FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes	41
6.2) Implication dans la régulation de la traduction	42
a) Etudes in vitro	42
b) Etudes in vivo	43
III) LE SYNDROME DE L'X FRAGILE : ETUDE DES MODELES ANIMAUX	45
1. CONTRIBUTION DU MODELE MURIN DANS L'ETUDE DU ROLE SYNAPTIQUE DE FMRP	45
1.1) Caractéristiques générales du modèle murin	45
a) Création du modèle murin	45
b) Phénotype global des souris Fmr1 ^{-/-}	46
1.2) Introduction aux bases de la mémoire	47
a) Définition	47
b) Plasticité des réseaux neuronaux ou bases cellulaires de la mémoire	47
c) Les bases moléculaires de la mémoire : les récepteurs au glutamate	48
1.3) Implication de FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : le modè	le des récepteurs au
glutamateglutamate	
a) Mise en évidence d'altération de la plasticité synaptique dans le cerveau des souris Fn	nr1 ^{-/-} 50
b) FMRP et les récepteurs mGluR : partenaires dans la régulation de la traduction synap	-
1.4) Rôle des récepteurs GABA dans le syndrome de l'X fragile	52
1.5) Le transport des granules d'ARN jusqu'aux synapses	53
1.6) Le modèle de pathologie synaptique des récepteurs au glutamate	54
2. LE MODELE DROSOPHILE : LIEN ENTRE FMRP ET LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE	55
2.1) Caractéristiques générales du modèle drosophile	55
a) La protéine dFXR	55
b) Création du modèle drosophile	
c) Caractéristiques phénotypiques générales des drosophiles dFmr1 ^{-/-}	
2.2) Etude du modèle drosophile	56
a) dFXR participe à la réorganisation du cytosquelette de microtubules	
b) dFXR module le cytosquelette d'actine au niveau des synapses	
3. Apport des modeles animaux dans la recherche d'un traitement du synde	ROME DE L'X FRAGILE 58

IV. LA TRADUCTION EUCARYOTIQUE : MECANISMES GENERAUX ET REGULATION	60
1. La traduction	
1.1) L'initiation de la traduction coiffe dépendante	60
1.2) L'initiation de la traduction coiffe-indépendante	61
2. REGULATION DE LA TRADUCTION PAR LES FACTEURS PROTEIQUES	61
2.1) Inhibition globale de la synthèse protéique : régulation par phosphorylation des facteurs d'initia	
2.2) Inhibition du recrutement du complexe 43S	
a) Blocage stérique/dégradation	63
b) Inhibition de la protéine eIF4E	64
3. REGULATION DE LA TRADUCTION PAR LES ARN NON CODANTS	65
3.1) Les ARN non codant neuronaux BC1/BC200	65
3.2) Le mécanisme d'ARN interférence	66
a) Origine et biosynthèse des siARN et des miARN	66
b) Les composés et la formation du complexe RISC	67
c) Mécanismes d'action des siARN et des miARN	68
4. LES STRUCTURES CYTOPLASMIQUES A ARNM: LES GRANULES A ARNM	
4.1) Les granules des cellules germinales	73
4.2) Les granules neuronaux à ARN	73
4.3) Les granules de stress	74
4.4) Les Processing-Bodies	76
4.5) Liens entre les granules à ARN	77
PUBLICATION 1	79
OBJECTIFS DE LA THESE	80
RESULTATS	83
I. ETUDE DU ROLE DE L'INTERACTION FMRP/G-QUARTET SUR L'EXPRESSION GENIQUE	84
1. Role de l'interaction FMRP/FBS	84
1.1) Objectifs de l'étude	84
1.2) Publication 2	84
1.3) Discussion et perspectives	87
2. ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'INTERACTION FMRP/G-QUARTET SUR L'EXPRESSION IN VIVO D'UN GENE	
RAPPORTEUR	89
2.1) Objectifs de l'étude	89
2.2) Etude de l'interaction FMRP/G-quartet sur un gène rapporteur	89
a) Système expérimental	
b) Influence de FMRP et d'un G-quartet localisé dans la région 5' UTR d'un gène rapporteur	90
c) Influence de FMRP et d'un G-quartet localisé dans la région 3' UTR d'un gène rapporteur	91
2.3) Etude de l'ARNm PSD-95, cible neuronale de FMRP	92
a) L'ARNm PSD-95 contient un quartet de guanines	92

b) FMRP interagit spécifiquement avec l'ARNm PSD-95 via une structure en quartet de purines	93
c) Etude de l'impact de FMRP et de la région 3' UTR de PSD-95 sur l'expression in vivo d'un gène rapporte	
2.4) Discussion et perspectives	96
II. ETUDE DE L'IMPLICATION DE FMRP DANS LE METABOLISME DES ARNM NON TRADU	ITS
	99
1. Objectifs de l'etude	99
2. Publication 3	99
3. ETUDE DE L'IMPACT DE FMRP SUR LA PHOSPHORYLATION D'EIF2α	102
4. ANALYSE DE L'IMPACT DE FMRP SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE EN CONDITION DE STRESS	102
5. Etude de l'impact de FMRP dans la formation des granules de stress dans les neurones	103
6. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	104
III. L'ARNM SOD1, NOUVELLE CIBLE, NOUVEAU MOTIF RECONNUS PAR FMRP	108
1. Objectifs de l'etude	108
2. Publication 4	108
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	111
MATERIEL ET METHODES	116
I. PLASMIDES	117
1. Plasmides d'expression de FMRP (pTL-1- <i>Fmr1</i>)	117
2. CONSTRUCTIONS POUR LES TESTS D'EXPRESSION DE LA LUCIFERASE	117
2.1) Plasmides pour l'expression de la luciferase Renilla	117
a) Plasmide pRL-TK	117
b) Constructions pRL-TK	117
2.2) Plasmide pour l'expression de la luciferase Firefly	119
II. TESTS CELLULAIRES	120
1. LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE	120
1.1) Préparation des cultures primaires	120
a) Fibroblastes	120
b) Neurones	121
1.3) Traitements des cellules	121
2. Transfections des cellules	122
3. MESURES DES ACTIVITES LUCIFERASE	122
4. RT-PCR QUANTITATIVE	123
5. Western-blot sur eIF 2α et eIF 2α phosphorylee	124
6. MARQUAGE METABOLIQUE AVEC LA METHIONINE ³⁵ S	124
III. VERIFICATION DE LA PRESENCE D'UN MOTIF G-QUARTET EN REGION 3' UTR DE L'AI	RNM
PSD-95	125
1 Preparation de l'ARN de la region 3' UTR de <i>PSD-95</i>	125

2. MARQUAGE DE L'EXTREMITE 5' DE L'AMORCE OLIGONUCLEOTIDIQUE	126
3. Transcription inverse	126
BIBLIOGRAPHIE	112

ABRÉVIATIONS

82-FIP 82kDa-FMRP Interacting Protein

A Adénine

AcNa Acétate de Sodium

ADN (DNA) Acide DésoxyriboNucléique (DesoxyriboNucleic Acid)

Ago Argonaute protein

AMPA α-Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazolePropionic Acid

APRA Antibody-Positionned RNA Amplification

Arg Arginine

ARC Activity-Regulated Cytoskeleton associated protein

ARN (RNA) Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid)

ARNm ARN messager
ARNr ARN ribosomique

ATP Adénosine Tri-Phophate
BC1 Brain Cytoplasmic RNA 1

BDNF Brain-Derived Neurotrophic Factor

BDAG1 Dystroglycan-Associated Glycoprotein 1

BiFC BImolecular Fluorescence Complementation

BSA Bovin Albumin Serum

C Cytosine Ca²⁺ Calcium

CaMKII Calcium caModuline-dependant Kinase II

CAT1 Cationic Amino-acid Transporter 1
CDK4 Cyclin D dependent Kinase 4

CKII Casein Kinase II

CO₂ dioxide de carbone

CYFIP1/2 CYtoplasmic FMRP Interacting Protein ½

°C degré Celsius

ddNTPDi-Désoxy Nucleotide Tri-PhosphateDHPGDiHydroxyPropoxymethylGuanineDMEMDubelcco's Modified Eagle's MediumdNTPDésoxyNucleotide Tri-Phosphate

DTT dithiotréhitol

EDTA acide EthylèneDiaminoTétraAcétique

EF-1A Elongation Factor 1 A

eIF2C2 Eukaryotic Initiation Factor 2C2
ERK Elk-Related tyrosine Kinase

EtOH Ethanol

FGF-2 Fibroblast Growth Factor 2

Fluc Firefly luciferase

Fmr1 Fragile X Mental Retardation 1

FMRP Fragile X Mental Retardation Protein

FRAXA FRAgile chromosome X site A FXR1/2P Fragile X Related Protein 1/2

FXTAS Fragile X Tremor Ataxia Syndrome

G Guanine

G6PD Glucose 6 Phosphate Deshydrogenase

GDP Guanines Di-Phosphate

G-quartet guanine quartet

GRK2 G protein-coupled Receptor Kinase 2

GTP Guanines Tri-Phosphate

h heure H3/4 Histone 3/4

HCl Chlorure d'Hydrogène HeLa HEnrietta LAcks

hnRNP heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
HSV-TK Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase

HuR Hu antigen R

iso1 Isoforme 1 de FMRP (codée par l'ensemble des 12 exons)

iso7 Isoforme 7 de FMRP (dépourvue de l'exon 12)

Iso/I Isoleucine

IU International Unit (unité internationale)

K⁺ Potassiumkb KiloBase

kc1 Kissing Complex 1
KCl Chlorure de Potassium

kDa KiloDAlton

KH1/2 hRNP K Homology 1/2

L5/11 Large ribosomal protein 5/11

LDP Long Term Depression
LiCl Chlorure de Lithium

LIMK1 LIM (Lin-11, Isl-1 and Mec-3) domain Kinase-1

LTP Long Term Potentiation

Lys Lysine
M Molaire

m⁷Gppp Methyl-7-Guanosine tri-Phosphate

mA MilliAmpère

MAP1B Microtubule Associated Protein 1B

MeOH Méthanol

μg MicroGramme

 $\begin{array}{lll} miARN & microARN \\ \mu m & micromètre \\ MID1 & MIDline 1 \\ \mu l & MicroLitre \\ min & minute \\ \end{array}$

miR-122 microRNA 122 miR-134 microRNA 134 Mg²⁺ Magnésium

MgSO₄ Sulfate de Magnésium

mGluR Metabotropic GLUtamate Recepteur

MLN51 Metastatic LymphNode 51
MLT Mémoire à Long Terme
MSP58 MicroSPhérule 58

mTOR Mammalian Target Of Rapamycin

N Asparagine
Na⁺ Sodium

NaCl Chlorure de sodium

NDF N-terminal Domain of FMRP

NES Nuclear Export Signal
NGF Neuronal Growth Factor
NLS Nuclear Localisation Signal

Nm Nanomètre

NMDA N-Methyl-D-Aspartate

NUFIP NUclear FMRP Interacting Protein
OMS Organisation Mondiale de la Santé

P-Bodies Processing Bodies

PBS Phosphate Buffer Saline
PC12 Pheatochromocytoma 12
PCR Polymerase Chain Reaction
POF Premature Ovarian Failure
PP2A Protein Phosphatase 2A
PSD Post-Synaptic Density

PSD-95 Post-Synaptique Density 95 kDa protein Pur α PUrine-Rich element-binding protein α

QI Quotient Intellectuel

Rac1 RAs-related C3 botulinum toxin substrat
RER Réticulum Endoplasmique Rugueux
RISC RNA Induced Silencing Complex

RGG Arginine-Glycine

RGS5 Regulator of G protein Signalling 5

INTRODUCTION

I. LE SYNDROME DE L'X FRAGILE : DÉCOUVERTE, CARACTÉRISATIONS CLINIQUE ET GÉNÉTIQUE

1. Les retards mentaux

1.1) Définition et diagnostic des retards mentaux

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on considère que « le retard mental est un arrêt du développement mental ou un développement mental incomplet, caractérisé par une insuffisance des facultés intellectuelles et du niveau global d'intelligence, notamment des fonctions cognitives, du langage, de la motricité et des performances sociales. Des capacités intellectuelles réduites sont le trait dominant de ce trouble, mais on ne pose le diagnostic que si elles s'accompagnent d'une moindre capacité d'adaptation aux exigences quotidiennes de l'environnement social » (source : site web de l'OMS). Selon l'Association Américaine de Psychiatrie, l'âge de la survenue de la déficience doit être inférieur à 18 ans.

L'évaluation du fonctionnement intellectuel global est réalisée à l'aide de plusieurs tests psychométriques standardisés permettant d'apprécier le diagnostic d'un retard mental et sa sévérité (pour revue, (Chelly, 2000)). Ces tests définissent les capacités de l'individu à résoudre des problèmes, à atteindre le degré d'autonomie personnelle attendu selon son âge, son contexte socioculturel et environnemental. Le résultat est exprimé sous la forme d'un score, le Quotient Intellectuel plus communément appelé QI. La valeur moyenne du QI dans la population générale est de 100. Les retards mentaux sont définis par un QI<70 et hiérarchisés selon une gamme (figure 1). Les retards mentaux sont légers lorsque le QI est compris entre 70 et 50, modérés lorsqu'il est compris entre 49 et 35, sévères lorsqu'il est compris entre 34 et 20 et profonds lorsqu'il est inférieur à 20 (figure 1).

1.2) La prévalence et les causes des retards mentaux

À partir des critères décrits précédemment, on estime que la prévalence du retard mental est de 1% de la population mondiale si l'on concidère le retard mental sévère, et s'élève à 2-3% si l'on inclut les déficiences intellectuelles légères (source : site Web de

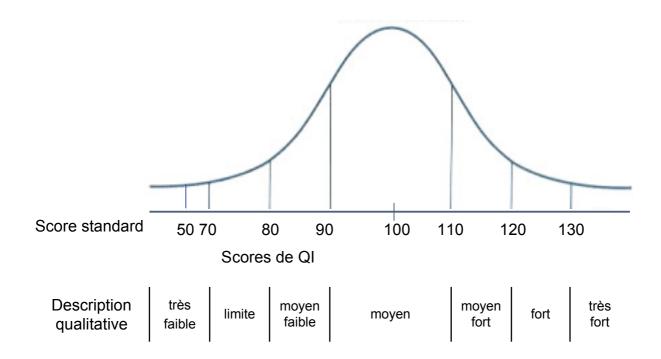


Figure 1. Répartition de la population selon le résultat obtenu au test de QI Dans la population générale, la moyenne des scores réalisés est de 100. On parle de retard mental lorsque le QI est inférieur à 70. Le retard mental est sévère lorsque le QI est inférieur à 35. (adapté de Chelly, 2000)

l'OMS). La prévalence est plus forte dans les pays en voie de développement, en raison d'un plus fort taux d'accidents traumatiques périnataux et d'un risque infectieux plus élevé pendant l'enfance (source : site Web de l'OMS).

Les causes identifiées des retards mentaux sont diverses et non exhaustives, puisqu'une étude en Suède révèle que l'origine d'un retard mental demeure indéterminée dans 40-60% des cas (Chelly, 2000).

Les causes de retard mental identifiées sont subdivisées en trois grands groupes (Chelly, 2000):

- les causes biologiques inhérentes à l'individu : malformatives, chromosomiques (syndrome de Down, syndrome Prader-Willi et d'Angelman), monogéniques (syndrome de l'X fragile).
- les causes infectieuses anténatales (listériose, toxoplasmose, rubéole, ...) ou postnatales (méningite).
- les causes environnementales traumatiques (anoxie à la naissance, syndrome du « bébé secoué »...), dues à la consommation de substance tératogène pendant la grossesse (alcool, drogues, ...), ou encore alimentaire. En effet, la carence en iode est, selon l'OMS, une cause majeure de retard mental dans certains pays et constitue la première cause évitable de lésions cérébrales et d'arriération mentale.

1.3) La classification des retards mentaux liés au chromosome X

Les retards mentaux liés au chromosome X (RMLX) sont d'origine génétique avec la localisation du gène responsable de la maladie localisé sur le chromosome X (Chelly and Mandel, 2001; Ropers and Hamel, 2005) (figure 2). Ils forment un groupe de maladies hétérogènes qui ont en commun une déficience mentale de sévérité variable, un caractère héréditaire avec risque de plusieurs personnes affectées dans une même famille, majoritairement des hommes.

La classification des retards mentaux la plus utilisée est basée sur l'identification des symptômes cliniquement observables. On distingue alors deux types de RMLX en fonction de l'association d'autres troubles au retard mental :

- les RMLX dits non syndromiques (RMLX-NS) ou non spécifiques sont isolés, non progressifs et sans autre anomalie clinique. Ce groupe représenterait les deux tiers des RMLX, même si son importance relative diminue au fur et à mesure de la découverte de critères diagnostiques de plus en plus pointus (Ropers and Hamel, 2005). Les gènes

RMLX-S RMLX-NS

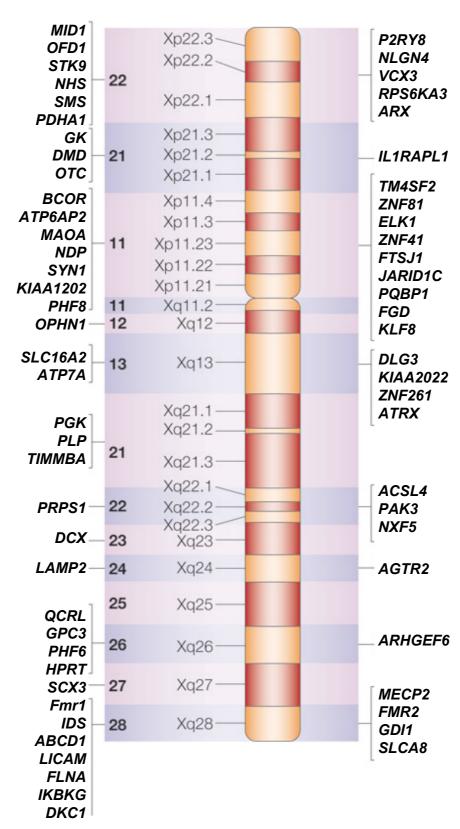


Figure 2. Répartition des gènes impliqués dans des retards mentaux liés à l'X (RMLX) le long du chromosome X

Les gènes impliqués dans des RMLX syndromiques (RMLX-S) sont indiqués à gauche du chromosome, et ceux impliqués dans des RMLX non syndromiques (RMLX-NS) à droite. (adapté de Ropers, 2005)

responsables de RMLX-NS participent directement aux processus liés aux fonctions cognitives de mémorisation, apprentissage, comportement...

- les RMLX dits syndromiques (RMLX-S) ou spécifiques associent un retard mental à des anomalies anatomiques et/ou biochimiques (tableau 1). Les gènes impliqués dans les RMLX-S sont très divers et participent à de multiples processus cellulaires de sorte qu'il est souvent difficile de comprendre le lien exact entre le défaut moléculaire et la déficience cognitive observée.

La classification des retards mentaux peut également être établie sur la base de leur cause (génétique, environnementale ou une combinaison des deux) et/ou leur période d'apparition (pré, péri ou post-natale) (Chiurazzi et al., 2008; Moog, 2005).

Le syndrome de l'X fragile est le premier RMLX-S à avoir été identifié et expliqué génétiquement. Il constitue la cause la plus fréquente de RMLX-S et explique 2 à 3% des retards mentaux chez les hommes et 1% chez les femmes.

2. Identification d'un site fragile comme marqueur chromosomique d'un retard mental lié à l'X : le syndrome de l'X fragile

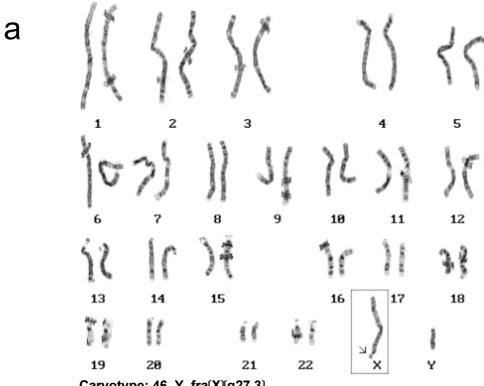
C'est en 1969, qu'est rapportée l'existence d'une anomalie à l'extrémité du bras long du chromosome X (Xq) chez une femme et ses quatre fils atteints de retard mental (pour revue (Hagerman, 1987)). Cette anomalie sera caractérisée comme étant un site "fragile", nommé FRAXA (FRAgile chromosome X site A). Un site "fragile" correspond à une zone de la chromatine présentant une cassure apparente sur le chromosome lors de la réalisation d'un caryotype (figure 3a-b). Ce phénomène est visible lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en folate (Sutherland, 1977). Il s'agirait d'une constriction de la chromatine en rapport avec la nature la mutation du gène Fmr1 (§ II-1-1.2). Un site fragile apparaît à l'extrémité du chromosome X (Xq) chez les patients souffrant de retard mental (Hagerman, 1987). De plus, le cas de patients présentant une macroorchidie (augmentation du volume testiculaire) est décrit dans le cadre de retard mental lié au chromosome X (RMLX) (Turner et al., 1980). L'application de la technique de culture (milieu pauvre en folate) à ces patients permet d'établir un lien entre ce RMLX, la macroorchidie et l'existence du site fragile. L'existence d'un retard mental syndromique transmis via le chromosome X est alors établie et devient plus connue sous le nom de syndrome de l'X fragile. D'autres formes de retards mentaux syndromiques liés à l'X sont découvertes dans les années suivantes. En 1985, le site

GENE	SYNDROME ASSOCIE	SOCIE FONCTION DE LA PROTEINE		
ARX	Syndrome de West/Partington/Proud Lissencéphalie liée à l'X	Facteur de transcription		
ATP6AP2	Epilepsie	Récepteur à la rénine activant les protéines ERK1/2		
BCOR	Microphtalmie de Lenz	Répression de la transcription par remodelage de la chromatine		
CDKL5	Spasmes infantiles	Sérine-thréonine kinase : remodelage de la chromatine		
GK	Déficience en Glycérol kinase	Translocation nucléaire du complexe récepteur- glucocorticoïdes		
JARIDIC	Microcéphalie/spasticité/epilepsie	Facteur de transcription : remodelage de la chromatine		
MECP2	Syndrome de Rett	Remodelage de la chromatine et répression de la transcription de gènes neuronaux		
PHF6	Syndrome de Borjeson-Forssman-Lehman	Protéine à doigt de zinc : régulation de la transcription		
PHF8	Syndrome de Siderius-Hamel	Protéine à doigt de zinc : régulation de la transcription		
RSK2	Syndrome de Coffin-Lowry	Sérine-thréonine kinase du facteur de transcription CREB		
XNP/ATRX	Syndrome de Carpenter-Waziri/Chudley-Lowry- Hoar/Holmes-Gang/Juberg-Marsidi/Smith-Fineman- Myers et thalassémie alpha liée à l'X	ADN hélicase : remodelage de la chromatine		
FGD1	Syndrome d'Aarskog-Scott	Rho GEF (Guanine Exchange Factor) : réorganisation du cytosquelette d'actine		
FLNA	Syndrome oto-palato-digital	Liaison à l'actine : mise en place dans la formation des neurites et des épines dendritiques		
KIAA1202	Syndrome de Stocco dos Santos	Rôle putatif dans le remodelage du cytoquelette d'actine		
OPHN1	Syndrome d'hypoplasie/dysplasie cérébelleuse	Rho GAP (GTPase Activating Protein)		
Fmr1	Syndrome de l'X fragile	Régulation du transport et/ou de la traduction d'ARNm		
MAOA	Retard mental du à une déficience en monoamines oxidase A	Métabolisme de la sérotonine		
PQBP1	Syndrome de Renpenning/Golabi-Ito-Hall/Sutherland- Haan/cerebro-palatocardiaque d'Hamel	Epissage de l'ARN		
SLC16A	Anomalies thyroïdiennes et neurologiques	Transporteur T3		
SLC6A8	Syndrome de déficience en créatine	Transport de la créatine		
SMS	Snyder-Robinson Syndrome	Synthèse de la spermine		
SYN1	Macrocéphalie/Epilepsie	Protéine associée aux vésicules synaptiques		

Tableau 1. Principales formes syndromiques répertoriées de retards mentaux liés à I'X

Les deux grands groupes fonctionnels, correspondant aux gènes jouant un rôle dans la transcription et à ceux contrôlant l'organisation du cytosquelette d'actine sont indiqués respectivement en bleu et vert. Les gènes ne faisant pas partie de ces deux groupes sont indiqués en orange.

(d'après Ropers et al., 2005)



Caryotype: 46, Y, fra(X)(q27.3)

b



Figure 3. Marqueur du syndrome de l'X fragile, une "cassure" sur le bras long (q) du chromosome X en position 27.3

- a. Caryotype d'un individu atteint du syndrome de l'X fragile. Le chromosome X atteint est encadré. La flèche indique la position de la "cassure" due à la répétition CGG en 5' UTR du gène Fmr1.
- b. Visualisation par microscopie électronique du site fragile du chromosome X. La flèche indique la position de la "cassure" (Griffith et al., 2000).

caractéristique du syndrome de l'X fragile est localisé plus précisément en Xq27.3 (Krawczun et al., 1985).

3. Caractéristiques phénotypiques du syndrome de l'X fragile

3.1) Tableau clinique

L'ensemble des symptômes associés au syndrome de l'X fragile est résumé sur la figure 4.

a) Les troubles cognitifs

La sévérité du retard mental associé au syndrome de l'X fragile varie selon les individus et leur genre. La plupart des patients masculins souffrent d'un retard mental modéré avec un QI situé autour de 50. Pour 10 à 15% des patients, le retard mental est qualifié de léger et certains patients présentent un retard mental sévère (Hagerman, 1996). La sévérité du retard mental est moindre chez les femmes : 30 à 50% des patientes souffrent d'un retard mental léger et les 50 à 70% restant ont un QI compris entre 70 et 85 (Hagerman, 1996).

Dans la plupart des cas, la déficience intellectuelle apparaît précocement et peut être détectée dès l'âge de 3 ans grâce aux tests appropriés. Le retard mental, de léger à sévère, peut aller du simple retard scolaire dans les apprentissages à l'impossibilité d'acquérir l'écriture et la lecture. Les patients peuvent également souffrir de troubles de la parole : retard dans l'apparition du langage, des difficultés d'articulation, des dysrythmies et bredouillements, des tendances à l'écholalie (tendance à répéter les mêmes phrases et poser les mêmes questions) (source : site web "Association Nationale du Syndrome X fragile"). La coordination oculomotrice est également affectée, ce qui rend difficile l'apprentissage de l'écritue et la réalisation de dessins.

b) Les troubles comportementaux

Les patients atteints du syndrome de l'X fragile présentent généralement des troubles comportementaux marqués qui constituent donc un critère de diagnostic majeur. Les garçons atteints du syndrome de l'X fragile sont hyperactifs, impulsifs, peuvent être agressifs et présenter des troubles de l'attention (Tsiouris and Brown, 2004). Ils manifestent également des sentiments d'angoisse pouvant se traduire par une résistance face aux changements et une



Troubles du comportement

- Hyperactivité
- Tics et stéréotypies
- Anxiété
- Troubles du langage
- Autisme
- Troubles de la concentration
- Timidité
- Tendance dépressive



- Front large
- Visage allongé
- Oreilles proéminentes
- Strabisme



Atteinte du tissu conjonctif

- souplesse articulaire
- Prolapsus de la valve mitrale

Problèmes orthopédiques

- Pieds plats
- Scoliose

Otite

Macroorchidie



Figure 4. Caractéristiques phénotypiques du syndrome de l'X fragile

Deux individus affectés par le syndrome de l'X fragile. Observation d'aspects faciaux typiques tels qu'une légère malformation faciale, de larges oreilles ou un front proéminent. Notez le phénotype modéré chez les enfants (photo du haut), comparativement aux adultes (photos du bas). Les symptômes plus caractéristiques des filles sont en *italique* et ceux des garçons sont <u>soulignés</u>.

faible capacité d'adaptation (Hagerman, 2002). La plupart des patients sont également marqués par un comportement d'automutilation et des stéréotypies motrices comme des "battements d'ailes" (Hagerman et al., 1986). Parfois tous ces symptômes sont présents, et, associés à un contact visuel fuyant et au refus des contacts physiques, constituent un syndrome autistique (Kaufmann et al., 2004). Les différentes études réalisées parmi des patients autistes suggèrent que 5 à 7 % d'entre eux seraient atteints du syndrome de l'X fragile.

Chez les filles, les signes comportementaux de la maladie sont moins marqués que chez les garçons. Cependant, elles souffrent fréquemment de troubles de l'attention et du langage et présentent une tendance dépressive, une timidité associée à des difficultés relationnelles et un caractère changeant (Franke et al., 1998; Freund et al., 1993).

c) Autres troubles

À la naissance, les nouveaux-nés atteints du syndrome de l'X fragile ne présentent pas de symptômes décelables permettant l'établissement d'un diagnostic qui n'est, d'ailleurs, que rarement posé avant l'âge d'un an. Les signes cliniques deviennent plus caractéristiques dès la deuxième année, et se manifestent par une hypotonie et une hyperlaxité ligamentaire. Des retards psychomoteurs peuvent, dans les formes du syndrome les plus sévères, se traduire par un retard de l'apprentissage de la marche.

Le tableau clinique se précise ensuite au cours du développement et comporte :

- une dysmorphie faciale visible dans environ 64% des cas (Hagerman et al., 1984). Les patients présentent un visage allongé, un front haut, de grandes oreilles proéminentes.
- une atteinte des tissus conjonctifs se manifestant par une hyperlaxité ligamentaire chez 67% des patients (Hagerman et al., 1984).
- une macroorchidie (augmentation du volume testiculaire) chez 70% des garçons après la puberté (Lachiewicz and Dawson, 1994).
- des otites à répétition chez 85% des patients (Hagerman et al., 1987).
- des crises épileptiques chez 15% des patients (Musumeci et al., 1999).

3.2) Les caractéristiques anatomopathologiques cérébrales

a) A l'échelle anatomique

Les observations réalisées par autopsie sur des patients atteints par le syndrome de l'X fragile, n'ont pas permis l'identification de défaut morphologique majeur de leur cerveau. Cependant, plusieurs anomalies ont été décrites à l'échelle anatomique, dont une réduction ou une augmentation de la taille de plusieurs régions du cerveau (Reiss et al., 1991; Reiss et al., 1994).

b) A l'échelle cellulaire : les épines dendritiques

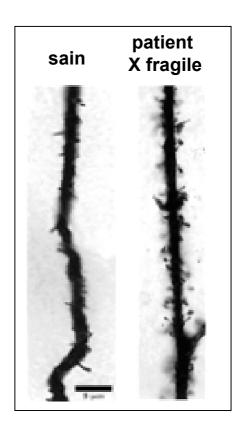
Les dendrites des patients atteints du syndrome de l'X fragile présentent des épines dendritiques surnuméraires et anormalement fines et tortueuses (figure 5a) (Hinton et al., 1991; Irwin et al., 2000). Il a été postulé que ces anomalies soient à l'origine des dysfonctionnements de la transmission synaptique et expliquent ainsi l'apparition du retard mental et des troubles comportementaux observés chez les patients.

Les épines dendritiques sont de petites protrusions membranaires émergeant des dendrites de la plupart des différents types de neurones, et au niveau desquelles s'établissent les jonctions synaptiques.

Les épines dendritiques sont formées d'une tête sphérique de $0,01~\mu m$ à $0,8~\mu m$ de diamètre et d'un cou étroit inférieur à $0,01~\mu m$ reliant la tête au prolongement dendritique. Cependant, leur morphologie est variable avec des épines fines pourvues d'un long cou et d'une tête de faible diamètre, des épines dépourvues de cou, et des épines en forme de champignon possédant une tête de grand diamètre (figure 5b) (McKinney, 2005; Tashiro and Yuste, 2003).

Contrairement au cytosquelette des dendrites, principalement constitué de microtubules, celui des épines dendritiques comporte essentiellement des filaments d'actine (Matus, 2000). Ces microfilaments forment des faisceaux parallèles au niveau du cou et de la tête des épines, et s'organisent en un réseau dense sous la membrane plasmique, notamment au niveau de la densité post-synaptique (PSD). Les épines dendritiques sont des structures labiles dont la morphologie évolue au cours du développement et lors de leur fonctionnement durant les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Parnass et al., 2000). La

a



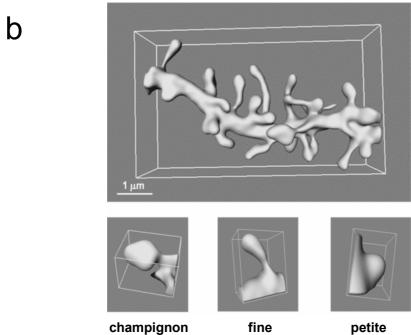


Figure 5. Les épines dendritiques : morphologie et anomalie dans le syndrome de l'X fragile

- a. Comparaison de la morphologie et de la densité des épines dendritiques observées chez un patient atteint du syndrome de l'X fragile par rapport à un individu sain. Les dendrites ont été colorées selon la méthode d'imprégnation de Golgi (adapté d'Irwin *et al.*, 2000).
- b. Reconstitution tridimensionnelle d'une portion de dendrite et de ses épines à partir de clichés de microscopie électronique. Les principaux types morphologiques sont indiqués 1) en forme de champignon, 2) fine et 3) petite (adapté de McKinney, 2005).

morphologie des contacts synaptiques reflète donc leurs caractéristiques fonctionnelles. Le remodelage des épines dendritiques est dû à la restructuration dynamique du cytosquelette d'actine (Matus, 2000). En effet, la morphologie des épines dendritiques ne change plus lorsque la polymérisation de l'actine est inhibée (Dunaevsky et al., 1999). Les épines dendritiques possèdent des récepteurs membranaires aux neurotransmetteurs, des canaux ioniques et l'ensemble de la machinerie nécessaire à la répression ou l'activation de la traduction locale d'ARNm (des polyribosomes, des microARN, des protéines du complexe RISC,...) (Tashiro and Yuste, 2003).

c) Les variabilités phénotypiques et la prévalence du syndrome

Chez les femmes, la présence d'un chromosome X normal, en plus du chromosome X porteur du site fragile, explique la sévérité moindre des symptômes associés au syndrome de l'X fragile. Dans chaque cellule, les gènes d'un seul des deux chromosomes sont exprimés, l'autre chromosome étant inactivé. Cette inactivation d'un des deux chromosomes est aléatoire expliquant que lorsque le chromosome fragile est inactivé la cellule fonctionne normalement car elle exprime l'ensemble des gènes à partir de la copie normale du chromosome X. La sévérité du phénotype est donc inversement proportionnelle au nombre de cellules dans lesquelles le chromosome fragile est inactivé. Cependant, une étude a démontré une inactivation préférentielle des allèles mutés dans les cellules sanguines de patientes, suggérant un processus de sélection qui favorise les allèles exprimant le gène normal (Rousseau et al., 1991).

Au sein d'un même sexe, la gravité du retard mental et des symptômes associés varie également. D'autre part, deux patients de même QI ne présentent pas nécessairement les mêmes troubles associés, qu'il s'agisse des symptômes physiques ou comportementaux. Cette variabilité s'explique en partie par le mécanisme mutationnel à l'origine du syndrome de l'X fragile (§ I-4-4.2-a).

Compte tenu de la variabilité des symptômes, l'estimation de la prévalence du syndrome de l'X fragile est délicate et souvent variable d'une étude à l'autre. Les tests de dépistage utilisant l'analyse de séquence ont permis une évaluation fiable de l'incidence. On estime actuellement que le syndrome de l'X fragile touche 1 garçon sur 4000 et 1 fille sur 6500 à 8000 (Murray et al., 1996; Turner et al., 1996).

4. Les causes génétiques du syndrome de l'X fragile

4.1) Le gène Fmr1

L'intégralité de la séquence codante du gène *Fmr1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) a été identifiée en 1991 (Verkerk et al., 1991).

Le gène *Fmr1* contient 17 exons et s'étend sur 38 kb au niveau de la région Xq27.3 du chromosome X (Eichler et al., 1993). Le transcrit complet de *Fmr1* mesure 3,9 kb : 0,2 kb et 1,8 kb correspondant respectivement aux régions 5' et 3' UTR (UnTranslated Region) et 1,9 kb correspondant à la séquence codante. Différents transcrits sont produits grâce à l'épissage alternatif du transcrit le plus long affectant la présence des exons 12 et 14 et le choix des sites accepteurs d'épissage des exons 15 et 17 (figure 6) (Ashley et al., 1993b; Verkerk et al., 1993).

Le degré de conservation du gène *Fmr1* est très élevé entre les espèces surtout chez les vertébrés (tableau 2). Les séquences d'acides aminés des protéines homologues de la souris (Ashley et al., 1993a), du poulet (Price et al., 1996) et du xénope (Siomi et al., 1995) sont identiques à, respectivement, 97%, 86,7% et 86% à la séquence de la protéine humaine. Ces scores sont analogues, voire supérieurs, à ceux de gènes codant des protéines ayant des fonctions biochimiques fondamentales comme l'α-globine ou la glucose 6-phosphate déshydrogénase. Plus récemment, un gène homologue, *dFXR*, a été mis en évidence chez la drosophile (Wan et al., 2000). Cependant, contrairement aux gènes homologues identifiés chez les autres espèces, le gène *dFXR* ne possède un pourcentage d'homologie que de 31% avec le gène *Fmr1* humain. Aucun orthologue n'a, à ce jour, été mis en évidence chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (tableau 2).

4.2) Les mutations du gène *Fmr1*

a) Le syndrome de l'X fragile, une maladie à expansion de triplets nucléotidiques

Du paradoxe de Sherman au modèle de l'expansion de trinucléotides CGG

C'est en analysant la transmission du syndrome de l'X fragile dans plusieurs familles qu'en 1985 Sherman a établit l'hypothèse du mode particulier de mutagenèse à l'origine du syndrome (Sherman et al., 1985). Sherman estima que la pénétrance du syndrome était de

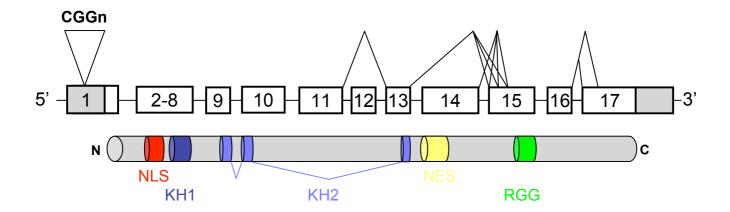


Figure 6. Structure du gène Fmr1 humain

Les exons sont représentés par des rectangles, les introns par des traits. Les régions 5' et 3' UTR sont en gris. Les sites d'épissage alternatif sont représentés au dessus du gène. Les positions des domaines fonctionnels sont indiquées en dessous du gène par des cylindres de couleur : NLS = Nuclear Localisation Signal; NES = Nuclear Export Signal; KH1/KH2 = hnRNP K Homology domain 1 et 2; RGG = boîte arginine, glycine, glycine.

	Pourcentage d'identité relativement aux séquences humaines					
Espèces	de nucléotides			d'acides aminés		
	Fmr1	G6PD	α-globine	FMRP	G6PD	α-globine
Canis familiaris	90,6	87,0		97,4	92,8	
Mus musculus	95,1	87,3	80,8	96,9	93,6	85,9
Rattus norvegicus	94,7	87,0	78,9	97,2	94,4	78,2
Gallus gallus	94,3	70,0	70,4	86,7	70,7	73,7

Tableau 2. Conservation interspécifique du gène Fmr1 par rapport aux gènes G6PD (Glucose 6 phosphate deshydrogenase) et α -globine

Source: NCBI-homologene

l'ordre de 80% chez les hommes et donc que 20% des individus porteurs de la mutation étaient asymptômatiques. Elle constata également que les filles de ces porteurs sains avaient un risque de transmettre le syndrome à leur descendance plus élevé que celui de leur grandmère, ou encore, que les petits-fils de ces porteurs sains étaient fréquemment atteints et leurs arrières petits-fils encore davantage. Afin d'expliquer ces observations, connues sous le nom de "paradoxe de Sherman", elle postula alors qu'il puisse exister une prémutation sans effet phénotypique susceptible d'évoluer vers une mutation complète lorsque transmise par la mère.

C'est en 1991 que les bases moléculaires du "paradoxe de Sherman" furent déterminées. L'existence d'une séquence chromosomique instable au niveau du site fragile a été mise en évidence grâce à l'identification, par Southern blot (Oberle et al., 1991; Yu et al., 1991), clonage et PCR (Fu et al., 1991; Kremer et al., 1991; Oberle et al., 1991), de fragments chromosomiques de taille variable, systématiquement plus longs chez les patients. Cette séquence chromosomique instable correspond à l'expansion d'une répétition du trinucléotide CGG au niveau de la région 5' UTR du gène *Fmr1*, 150 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription (figure 7).

Caractéristiques générales de la répétition CGG (figure 7)

Chez les individus sains, la taille de la répétition est extrêmement polymorphe variant de 6 à 50 triplets CGG (Kunst and Warren, 1994). Les allèles les plus fréquents comportent en moyenne 30 triplets. Les allèles constitués par 40 à 50 triplets pourraient être légèrement instables et représenter un groupe de transition vers les allèles mutés.

On considère deux classes de mutations : les prémutations et les mutations complètes. Les allèles prémutés sont constitués par des expansions modérées comportant de 55 à 200 triplets CGG. Les individus porteurs d'allèles prémutés ne présentent pas de retard mental et ont longtemps été considérés comme asymptômatiques. Cependant, les prémutations ont été associées à deux autres syndromes présents chez les individus porteurs de ces prémutations : la ménopause précoce identifiée chez les femmes (POF : premature ovarian failure) (Sherman, 2000) et le développement d'un trouble neurologique évolutif, le "syndrome d'ataxie à tremblements liée à l'X fragile" (FXTAS), chez 20 à 30% des hommes porteurs de plus de 50 ans (Hagerman and Hagerman, 2004). Un modèle drosophile exprimant la région 5' UTR du gène *Fmr1* humain comportant 90 CGG développe une neurodégénérescence et suggère que le FXTAS serait lié à une "toxicité" de l'ARN *Fmr1* (Jin et al., 2003). Enfin, la mutation complète à l'origine du syndrome de l'X fragile comporte de 200 à plus de 1000

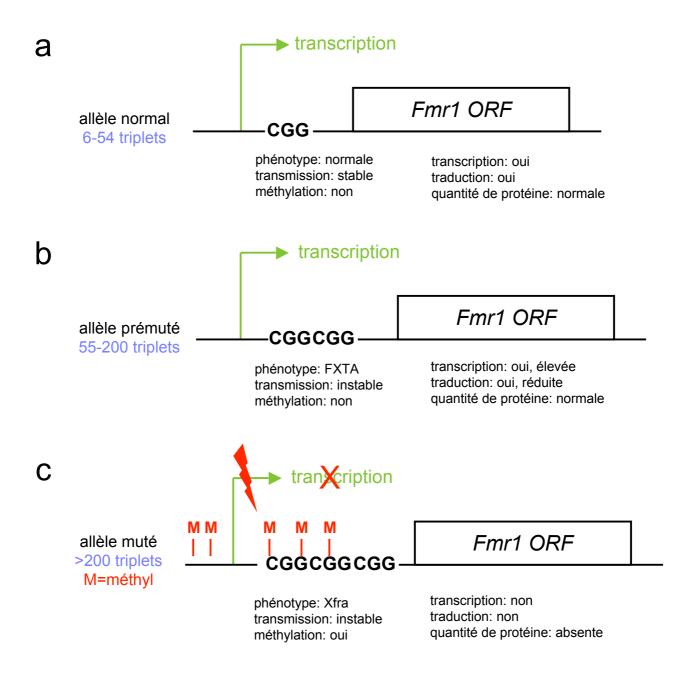


Figure 7. Représentation schématique des allèles du gène Fmr1

- a. Allèle d'un individu normal avec 6 à 50 répétitions CGG dans la région 5' UTR du gène *Fmr1*. Le gène de ces individus est entièrement transcrit.
- b. Allèle d'un individu prémuté qui contient de 50 à 200 répétitions. Le gène est transcrit mais la protéine produite à un niveau plus faible.
- c. La mutation complète apparaît lorsque le nombre de répétitions est supérieur à 200. La région promotrice du gène est hyperméthylée ce qui induit le silence du gène.

triplets CGG. Le passage de la prémutation à la mutation complète se fait uniquement par transmission maternelle avec une efficacité d'amplification proportionnelle à la taille de la prémutation.

Mécanisme d'expansion des répétitions de trinucléotides

L'expansion de la répétition trinucléotidique se fait par addition de triplets CGG supplémentaires à son extrémité 3'. Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'expansion des répétions n'a pas encore été clairement identifié. Il est suggéré que l'ADN polymérase glisse lors de la réplication sur des structures en épingle à cheveux formées par appariement des triplets CGG (pour revue (Stoyanova and Hoogeveen, 2005)).

La mutation génétique induit des modifications épigénétiques de Fmr1

L'expansion de la répétition CGG n'empêche pas elle-même la transcription de *Fmr1*, mais induit plusieurs phénomènes épigénétiques. Il y a méthylation des cytosines de la répétition elle-même et de la région promotrice du gène *Fmr1*. Parallèlement, le profil d'acétylation et de méthylation des histones est modifié (Coffee et al., 2002; Coffee et al., 1999). Les histones H3 et H4 sont désacétylées et la lysine 9 de l'histone H3 méthylée ce qui correspond à un état de transcription inactif du gène. L'ensemble de ces modifications épigénétiques induit l'inhibition de la transcription du gène *Fmr1* et, de ce fait, l'absence d'expression de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) (figure 8).

Cependant, chez les hommes porteurs de prémutations et chez certains porteurs sains de mutation complète, la répétition du gène transcrit est anormalement non méthylée (Smeets et al., 1995; Tassone et al., 2000a; Tassone et al., 2000b). Une hypothèse intéressante suggère l'implication de la machinerie RITS (RNA Induced Transcription Silencing) dans l'inhibition de la transcription de *Fmr1* à partir de CGG formant une structure en tige-boucle maturée par Dicer (Warren, 2007).

Des essais pharmacologiques de réactivation de la transcription de *Fmr1*, entrepris par utilisation d'analogue nucléotidique (5-azadeoxycytidine) ou d'inhibiteur de l'activité des histones désacéthylases (trichostatine A), ont permis une certaine restauration de la transcription de *Fmr1* dans les cellules de patients en culture (Chiurazzi et al., 1999; Chiurazzi et al., 1998; Pietrobono et al., 2002). Cependant, ces composés ont un faible intérêt thérapeutique en raison de leur toxicité, et de leur inutilité sur les cellules non proliférantes comme les neurones.

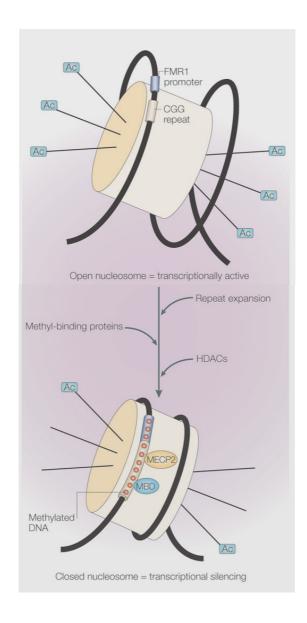


Figure 8. Modifications épigénétiques liées à l'expansion des répétitions CGG dans la région 5' UTR de *Fmr1*

Méthylation des cytosines de la région promotrice du gène et de la répétition elle-même, méthylation et acétylation des histones H3 et H4. Les cercles rouges représentent les groupements méthyl sur les cytosomes; le cylindre beige représente le nucleosome; Ac = acétyl; HDAC = Histone DeACethylase

b) Autres mutations

Bien que l'expansion des répétitions CGG soit retrouvée chez la plupart des patients affectés par le syndrome de l'X fragile, plusieurs cas de patients présentant les caractéristiques cliniques du syndrome sans l'expansion typique de triplets nucléotidiques ont été rapportés. Trois cas de mutations ponctuelles induisant une modification du cadre de lecture ou affectant un site d'épissage ont été identifiés (De Boulle et al., 1993; Lugenbeel et al., 1995). Un seul cas de mutation ponctuelle faux-sens est connu à ce jour (De Boulle et al., 1993). Cette mutation conduit au remplacement d'une isoleucine hydrophobe en asparagine hydrophile en position 304 de la chaîne d'acides aminés constituant la protéine FMRP (mutation I304N). Des délétions, partielles voire totales, du gène *Fmr1* ont également été décrites (Gedeon et al., 1992; Trottier et al., 1994; Wolff et al., 1997). Ces mutations ont pour conséquence la production d'une protéine FMRP inactive voire son absence de synthèse. La découverte de telles mutations, affectant l'intégrité du gène *Fmr1*, a permis de confirmer le rôle causal exclusif de l'inactivation de *Fmr1* dans l'apparition du syndrome de l'X fragile.

II. LA PROTÉINE FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN, FMRP

L'objectif de cette partie est de décrire les différentes fonctions possibles de FMRP à partir de l'étude de ses caractéristiques structurales et biochimiques pour aboutir à un modèle décrivant son fonctionnement global.

1. Expression de la protéine FMRP

Bien qu'ubiquitaire, l'expression de FMRP varie selon les tissus (Abitbol et al., 1993; Hinds et al., 1993). L'étude du profil d'expression de *Fmr1* dans différents tissus humains et murins, par hybridation *in situ* et immunohistochimie, a permis de définir la dynamique d'expression de FMRP au cours du développement embryonnaire. Chez la souris, FMRP n'est exprimée qu'à partir du 2^{ème} jour d'embryogenèse avec un niveau d'expression augmentant progressivement jusqu'au 14^{ème} jour dans tous les tissus murins testés (De Diego Otero et al., 2000). L'expression de FMRP semble particulièrement élevée dans les tissus d'origine ectodermique (cerveau, épithélium olfactif, ...), et dans les gonades. À partir du

14^{ème} jour et jusqu'à l'âge adulte, le niveau d'expression de FMRP reste identique dans le cerveau et les gonades alors qu'il diminue dans les muscles cardiaques et squelettiques (De Diego Otero et al., 2000). Des profils d'expression similaires ont été retrouvés chez les embryons humains à différents stades du développement (8, 9, 20 et 25 semaines du développement) (Abitbol et al., 1993; Tamanini et al., 1997).

Chez l'adulte murin et humain, le niveau d'expression de FMRP est très élevé dans les testicules, les ovaires et le cerveau, notamment au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet (Bakker et al., 2000; Devys et al., 1993).

Bien que le profil d'expression de FMRP semble ubiquitaire, il est intéressant de noter que son niveau de synthèse est le plus élevé dans le cerveau et les testicules, organes dont la morphologie et le fonctionnement sont touchés dans le syndrome de l'X fragile (figure 9) (Khandjian et al., 1995).

2. FMRP: une protéine aux différentes isoformes

La protéine FMRP correspond à un ensemble d'isoformes synthétisées à partir des différents ARNm produits par épissage alternatif du gène *Fmr1* (Verkerk et al., 1993). Une vingtaine d'isoformes différentes pourrait être théoriquement obtenue au vu des sites potentiels donneurs et accepteurs d'épissage et sur les bases de l'analyse des produits de RT-PCR quantitative (tableau 3) (Sittler et al., 1996). Cependant, seulement 4 à 6 bandes sont détectées par western-blot (figure 9) (Khandjian et al., 1995). Le poids moléculaire de ces isoformes varie de 70 à 80 kDa et pourrait correspondre à 10 isoformes différentes. L'isoforme la plus longue, codée par l'ensemble des exons, comporte 632 acides aminés (isoforme 1 ou iso1). L'isoforme la plus fréquente est dépourvue de l'exon 12 (isoforme 7 ou iso7) (figure 10) (Sittler et al., 1996).

3. Modifications post-traductionnelles de FMRP

3.1) Le domaine de phosphorylation

L'analyse de l'état de phosphorylation de FMRP a révélé que la région entre les résidus 483-521 peut être phosphorylée sur un, deux ou trois résidus. Cette région de 38 acides aminés constitue le domaine de phosphorylation localisé entre les domaines NES et

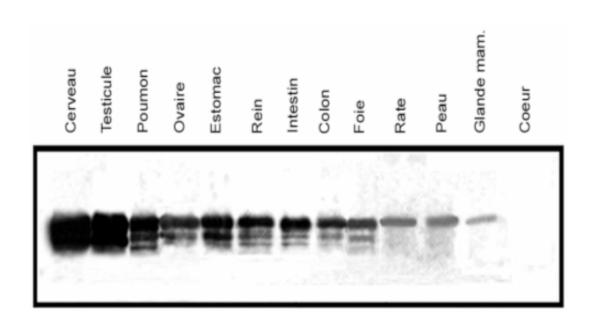


Figure 9. Expression de FMRP chez la souris adulte

Détection de FMRP par western-blot sur des extraits protéiques de différents tissus et organes de la souris adulte à l'aide de l'anticorps mAb1C3. (d'après Khandjian *et al.*, 1995)

	Site accepteur n°1 de l'exon 17				Site accepteur n°2 de l'exon 17			
Exon 12	+		-		+		-	
	14	74.4	17	20.0	140	00.4	147	00.0
а	lso1	71,1	lso7	68,9	Iso13	69,1	lso17	66,9
b	lso2	69,9	Iso8	67,7	Iso14	67,9	Iso18	65,7
С	lso3	68,4	lso9	66,2	Iso15	66,4	Iso19	64,2
∆14a	lso4	50,9	Iso10	48,7	Iso4		Iso10	
∆14b	lso5	49,5	Iso11	47,3	lso5		Iso11	
∆14c	lso6	61,0	lso12	58,8	lso6	59,0	lso20	56,8

Tableau 3. Différentes isoformes potentielles de FMRP

Différentes isoformes possibles de FMRP en fonction des sites accepteurs dans les exons 15 et 17 et de la présence de l'exon 12. La masse moléculaire de ces isoformes est indiquée en kDa. a, b, et c = site accepteurs 1, 2 et 3 dans l'exon 15; Δ 14 = délétion de l'exon 14.

(adapté de sittler et al., 1996)

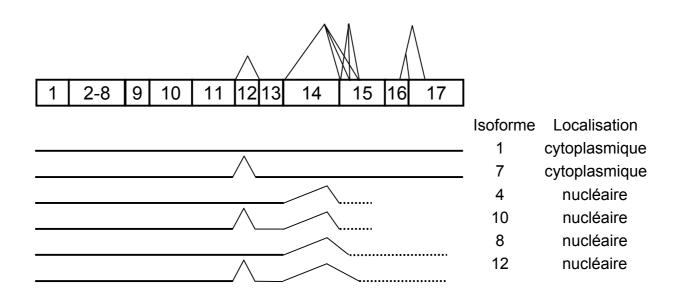


Figure 10. Structure et localisation de quelques isoformes putatives de FMRPL'isoforme 1 est l'isoforme la plus longue et l'isoforme 7 est l'isoforme majoritaire. Les pointillés indiquent un changement du cadre de lecture.
(adapté de Sittler *et al.*, 1996)

RGG (Ceman et al., 2003). Les effets de cette modification post-traductionnelle sur l'association de FMRP aux polysomes ont été analysés par deux équipes différentes dont les résultats sont contradictoires. Chez la souris, un défaut de phosphorylation de FMRP sur la sérine 499 n'altère pas sa capacité d'association avec les ARN (Ceman et al., 2003). A l'état basal, l'état de phosphorylation de FMRP ne semble jouer aucun rôle ni sur sa localisation cellulaire, ni sur son association aux polyribosomes (Ceman et al., 2003). Toutefois, des expériences de "ribosome run-off" ont montré que la phosphorylation de FMRP lui permet de rester associée aux polyribosomes malgré leur dissociation prématurée des ARNm (Ceman et al., 2003). En revanche, chez la drosophile, la phosphorylation de dFXR, réalisée sur la sérine 409 équivalente à la sérine 499 de FMRP mammifère, semble moduler son efficacité d'interaction avec les ARN et d'homodimérisation *in vitro* (Siomi et al., 2002).

Les conséquences précises de la phosphorylation de FMRP sur la traduction ne sont toutefois pas connues. Plusieurs études suggèrent que l'expression de certaines cibles ARNm de FMRP est en correlation avec l'état de phosphorylation de FMRP. Ce serait le cas de l'ARNm codant pour la protéine SAPAP3 (Synapse Associated Protein PSD-95 Associated Protein 3) identifié comme cible de FMRP (Brown et al., 2001; Welch et al., 2007; Welch et al., 2004). En effet, la quantité de SAPAP3 est augmentée dans les souris knock-out pour FMRP (Nakamoto et al., 2007) et en absence de phosphorylation de FMRP dans les souris sauvages (Narayanan et al., 2007). Après stimulation des neurones, la déphosphorylation rapide (<1min) de FMRP, associée à l'augmentation concomitente de SAPAP3, serait due à l'augmentation de l'activité de la phosphatase PP2A (Narayanan et al., 2007). En revanche, une activation plus longue des récepteurs au glutamate induit la diminution de l'activité de PP2A, médiée par mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin), ce qui aboutit à la rephosphorylation de FMRP. Ces résultats suggèrent que PP2A serait la principale phosphatase de FMRP dont l'activité est médiée par mTOR. D'autre part, l'absence de phosphorylation de FMRP associée à l'augmentation de la quantité SAPAP3 dans des cultures primaires de neurones hippocampaux de souris knock-out pour la kinase de la protéine ribosomale S6, S6K1 (protein S6 Kinase 1), suggère que S6K1 soit la principale kinase de FMRP (Narayanan et al., 2008). Ces résultats sont en adéquation avec le fait que PP2A inhiberait S6K1, et que mTOR régulerait PP2A et S6K1 (Van Kanegan et al., 2005). L'ensemble de ces résultats suggère un modèle selon lequel S6K1 et PP2A seraient en compétition pour FMRP médiée par l'activité de mTOR, elle-même régulée par les récepteurs au glutamate. La phosphorylation de FMRP serait couplée à l'inhibition de la traduction alors que sa déphosphorylation libèrerait les ARNm cibles vers la traduction suggérant ainsi une corrélation entre l'état de phosphorylation de FMRP et le profil de traduction de ces ARNm cibles.

Récemment, il a été montré que FMRP interagit avec MSP58, une protéine de liaison à l'ARN, grâce à son domaine de phosphorylation (Davidovic et al., 2006).

3.2) FMRP est une protéine méthylée

La phosphorylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle de FMRP. En effet, FMRP possède une région riche en arginine-glycine (la boîte RGG), cible préférentielle des méthyl-transférases (Kim et al., 1998). Il a été montré que FMRP est méthylée in vitro dans des extraits de réticulocytes de lapin (Denman, 2002; Denman et al., 2004) et in vivo dans des cellules HeLa (Dolzhanskaya et al., 2006a). Il semble que la méthylation de FMRP module son efficacité de liaison avec les ARN (Denman, 2002; Denman et al., 2004; Stetler et al., 2006) et en particulier un fragment d'ARN formant une structure en G-quartet in vitro (Stetler et al., 2006). Par ailleurs, in vivo, la méthylation de FMRP régule sa capacité à interagir avec FXR1P sans affecter sa localisation intracellulaire (Dolzhanskaya et al., 2006a). Chez la drosophile, dFXR est également méthylée (Stetler et al., 2006). En plus des méthylations constitutives de FMRP, il a été montré que la stimulation des cellules PC12 (Pheochromocytoma 12) de rat par le NGF (Neuronal Growth Factor) induit l'augmentation de la méthylation de FMRP (Najbauer and Aswad, 1990).Les sites de méthylation de FMRP et les méthylases impliquées doivent encore être identifiés. Contrairement aux phosphorylations, qui sont des modifications labiles équilibrées par les activités kinase et phosphatase, les méthylations apparaissent irréversibles aucune déméthylase n'ayant été identifiée à ce jour.

En dehors de la phosphorylation et de la méthylation, FMRP pourrait subir d'autres modifications telles que la N-glycosylation ou la N-myristoylation. Par ailleurs, bien que les phosphorylation et méthylation semblent réguler l'effet de FMRP sur la traduction, de nombreuses études doivent être entreprises afin de déterminer précisément qu'elles sont les effets des modifications post-traductionnelles de FMRP sur ses fonctions.

4. Les domaines fonctionnels de FMRP

4.1) FMRP, protéine navette entre le noyau et le cytoplasme

a) Le NES

En immunofluorescence, FMRP est majoritairement détectée dans le cytoplasme. Cependant des expériences de transfection de différentes isoformes ont permis de montrer que les isoformes dépourvues de l'exon 14 sont localisées dans le noyau (Sittler et al., 1996). Ces résultats ont conduit à l'identification d'un signal d'export nucléaire (NES) dans l'exon 14 de FMRP (Eberhart et al., 1996). La séquence du NES, Lys-Arg-Lys-X-Arg-Lys-X-Iso, pourrait former une structure en hélice α en interaction avec d'autres régions de FMRP (figure 11).

b) Le NLS

L'analyse des 184 premiers acides aminés de FMRP, suffisants pour sa localisation nucléaire, a permis d'identifier l'existence de groupes de résidus lysine et arginine conservés dans plusieurs domaines NLS connus (Eberhart et al., 1996). Une étude plus fine de la région N-terminale de FMRP a permis de localiser la séquence NLS entre les résidus 114 et 150 (Bardoni et al., 1997). L'activité de ce NLS peut être renforcée par les résidus 151 à 196 et plus particulièrement modulée positivement par deux groupes Lys-Lys et Lys-Arg aux positions 151-152 et 179-180, respectivement (Bardoni et al., 1997).

Ces deux études n'ont pu établir la présence d'une séquence NLS consensus constituée généralement de Lys-Arg/Lys-X-Arg/Lys avec X pouvant être lysine, proline, arginine, valine ou alanine (Chelsky et al., 1989). La localisation nucléaire de FMRP pourrait être expliquée par un repliement tridimensionnel constituant un signal d'interaction avec une protéine nucléaire cargo. La déstabilisation de cette structure tridimensionnelle par mutation de résidus essentiels pour sa fonction et/ou l'identification de ce cargo permettraient de comprendre par quel mécanisme FMRP pénètre dans le noyau.

La présence simultanée d'un NLS et d'un NES dans la séquence d'acides aminés de FMRP suggère qu'elle puisse faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cette hypothèse fut confirmée par expérience d'inhibition de l'export nucléaire, le traitement des cellules à la leptomycine B induisant une accumulation partielle de la protéine FMRP dans le noyau

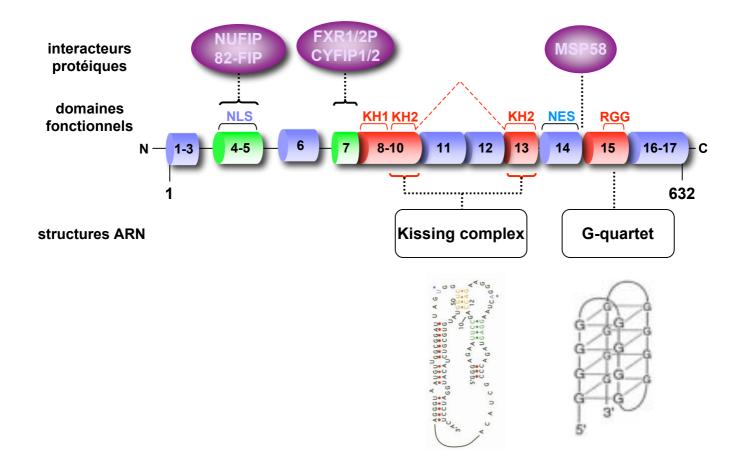


Figure 11. Représentation schématique des domaines fonctionnels de FMRP et des régions impliquées dans l'association à ses interacteurs

Le schéma indique la position des domaines fonctionnels le long de la séquence d'acides aminés. Les exons sont représentés par des cylindres numérotés. Les domaines potentiellement impliqués dans la liaison à l'ARN sont en rouge et les structures des motifs ARN reconnus par FMRP sont représentées en dessous du schéma. Les interacteurs protéiques sont représentés en prune.

NES = Nuclear Export Signal; NLS = Nuclear Localisation Signal; KH1/2 = hnRNP K Homology 1/2; RGG = boîte arginine-glycine-glycine; NUFIP = Nuclear FMRP Interacting Protein; 82-FIP = 82 kDa-FMRP Interacting Protein; FXR1/2P = Fragile X Related Protein 1/2; CYFIP 1/2 = Cytoplasmic Interacting Protein; G-quartet = quartet de quanines

(Tamanini et al., 2000). De plus, FMRP a été détectée au niveau des pores nucléaires en microscopie électronique (Feng et al., 1997b). Une fraction de FMRP pourrait donc être en transit entre le noyau et le cytoplasme au sein de la cellule.

4.2) FMRP et ses domaines de liaison à l'ARN

a) Les domaines KH

FMRP contient deux domaines KH, KH1 (acides aminés 212 à 266) et KH2 (acides aminés 285 à 328) (figure 11), présentant les caractéristiques des domaines KH de type II (figure 12a). Comme leur nom l'indique, les domaines KH ont été identifiés initialement dans la protéine hnRNP K (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K) (Siomi et al., 1993a). Au niveau structural, les domaines KH comportent classiquement environ 70 acides aminés adoptant une structure tridimensionnelle formée par l'enchaînement de brins β et d'hélices α (motif typique $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$) entre lesquels s'insèrent deux boucles, dont une boucle Gly-X-X-Gly invariante localisée au centre du domaine (Burd and Dreyfuss, 1994; Musco et al., 1996). Même si le rôle exact de ce type de domaine reste actuellement inconnu, celui-ci est présent dans une vaste famille de protéines ayant pour point commun de s'associer physiquement et/ou fonctionnellement aux ARN suggérant que ces motifs constituent des domaines de liaison aux ARN.

L'importance fonctionnelle de ces domaines fut soulignée par l'identification d'un patient X fragile présentant un phénotype sévère associé à la mutation ponctuelle I304N, évoquée précédemment (§ II-4-4.2-b), dans le domaine KH2. Cette mutation modifie la structure tridimensionnelle du domaine KH2 (Musco et al., 1996) et semble altérer les propriétés de liaison à l'ARN de FMRP (Brown et al., 1998; Siomi et al., 1994). Son association aux polyribosomes (Feng et al., 1997a) et son rôle dans la régulation de la traduction sont également affectés (Laggerbauer et al., 2001).

Des expériences de filtration par chromatographie sur gel et de sédimentation par ultracentrifugation ont montré que les domaines KH1 et KH2 forment un monomère en solution. La résolution de la structure des domaines KH1 et KH2 de FMRP par cristallographie a permis de mettre en évidence la fonction du résidu isoleucine 304 (figure 12b) (Valverde et al., 2007). L'isoleucine 304 fait partie d'un réseau de résidus hydrophobes stabilisant les hélices α sur le feuillet β. Cette conformation rend la position 304 complètement inaccessible. Ce résultat démontre que le résidu isoleucine 304 ne participe pas

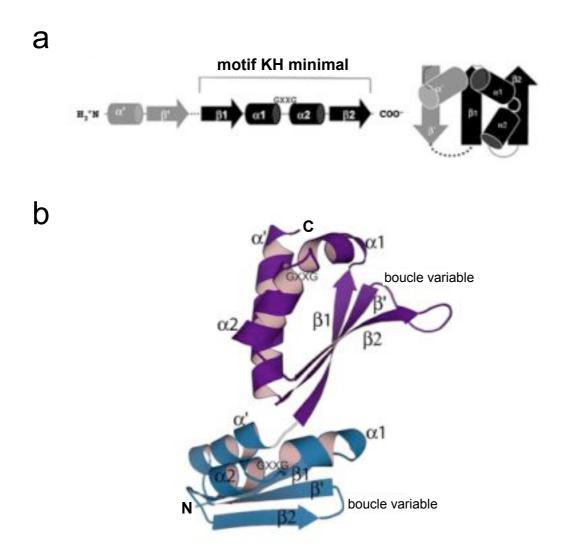


Figure 12. Structure et repliement des domaines KH

- a. Représentation des domaines KH de type II.
- b. Structure cristallographique des domaines KH1-KH2 de hFMRP. En bleu, le domaine KH1; en violet, le domaine KH2. (d'après Valverde *et al.*, 2007)

à l'interaction directe entre FMRP et les ARN, et que sa mutation en asparagine doit empêcher le repliement du domaine et déstabiliser la structure de la protéine.

b) La boîte RGG

La boîte RGG de FMRP est localisée entre les acides aminés 527 et 558 dans l'exon 15 (figure 11). Le domaine RGG, constitué par un groupe de résidus glycine et arginine, a été initialement identifié dans la protéine hnRNP U (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein U) puis dans de nombreuses protéines de liaison aux ARN (hnRNP A1, fibrillarine, nucléoline, ...) (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). La séquence riche en glycine et arginine confèrerait à la protéine des propriétés de liaison à l'ARN *via* des forces électrostatiques nonspécifiques.

4.3) Les domaines d'interaction protéine-protéine

La séquence des 217 premiers acides aminés de FMRP représente une région pour les interactions protéine-protéine (figure 11).

a) Le domaine NDF

La région N-terminale de FMRP, appelée NDF (N-terminal Domain of FMRP) (Adinolfi et al., 2003), est formée de deux sous-domaines répétés, NDF1 (résidus 3-50) et NDF2 (résidus 63-113) reliés par un fragment de 20 résidus, et d'une région C-terminale (résidus 114-134) contenant une hélice α simple (résidus 122-126). NDF 1 et 2 sont repliés en feuillet β et constitués chacun de quatre brins β anti-parallèles et d'un cinquième brin β fermant la cavité formée par le feuillet β. L'interaction entre ces deux domaines est assistée par des résidus tryptophane et phénylalanine. Des mutations déstabilisant le repliement du domaine NDF affectent la localisation cellulaire de FMRP. Par exemple, une double mutation des acides aminés 125 et 126 de l'hélice α de l'isoforme 12 (iso12), isoforme présente normalement dans la région péri-nucléolaire, provoque sa diffusion dans tout le noyau (Bardoni and Mandel, 2002). Ces résultats reflètent l'importance du repliement du domaine NDF pour la localisation nucléaire spécifique de FMRP. Par ailleurs, l'analyse comparative de la région N-terminale de FMRP avec les séquences d'autres protéines a permis d'observer des similarités significatives entre le NDF et les domaines d'interaction protéine-protéine

Tudor et Agenet (Maurer-Stroh et al., 2003). Un feuillet β de quatre brins représente une caractéristique commune des membres de cette famille de domaines suggérant l'implication du NDF de FMRP dans des interactions protéine-protéine. Par ailleurs, la résolution de la structure du domaine NDF de FMRP a permis de mettre en évidence une forte similarité structurale avec le domaine de la protéine SMN malgré la faible homologie de séquence (15%) partagée par les domaines de chacune des protéines. La plasticité de la cavité formée par le domaine NDF2 joue un rôle important dans les interactions avec les protéines NUFIP et 82-FIP (Bardoni et al., 2003a; Bardoni et al., 2003b).

b) L'exon 7

La structure secondaire de la région de FMRP codée par l'exon 7, proposée par alignement de séquence, formerait un motif hélice-boucle-hélice. L'homodimérisation de FMRP s'établit par ce domaine grâce à l'interaction de deux motifs formant ainsi un groupe de quatre hélices (Adinolfi et al., 2003). Par ailleurs, ce domaine permettrait également les interactions entre FMRP et les protéines FXR1, FXR2, CYFIP1 et CYFIP2.

5. Les différents interacteurs de FMRP

5.1) FMRP, une protéine de liaison à l'ARN

a) Mise en évidence

Plusieurs études ont, tout d'abord, montré que FMRP est capable de se lier à des homopolymères ribonucléotidiques *in vitro*, avec une forte affinité pour les séquences polyG et polyU, mais une affinité plus faible pour les séquences polyA et polyC (Brown et al., 1998; Siomi et al., 1994; Siomi et al., 1993b). FMRP serait capable de se lier à environ 4% des ARNm de cerveau fœtal humain (Ashley et al., 1993a). FMRP s'associe également son propre ARNm (Ashley et al., 1993a; Brown et al., 1998; Schaeffer et al., 2001). Il a été montré au laboratoire que, *in vitro*, FMRP se lie spécifiquement et avec une forte affinité à un motif en quartet de guanines ou G-quartet (Schaeffer et al., 2001). L'utilisation de la technique de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) a permis de confirmer cette interaction entre FMRP et les G-quartets (Darnell et al., 2001).

In vivo, l'interaction entre FMRP et des ARNm cibles avait été suggérée lors d'expériences de chromatographie d'affinité par la rétention de FMRP, provenant d'extraits cytoplasmiques, sur des colonnes d'oligodT (Corbin et al., 1997). Plusieurs méthodes de criblage à grande échelle ont également été utilisées pour identifier des cibles ARNm de FMRP in vivo. L'analyse par micropuces à ADN des ARNm associés à FMRP, isolée par immunoprécipitation, a permis l'identification de plusieurs centaines d'ARNm candidats dans des extraits de cerveau de souris et de lymphoblastes humains et une liste de 80 ARN a été présentée (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 (APRA ou Antibody-Positionned RNA Amplification), a identifié sur macropuces 81 autres ARNm neuronaux cibles (Miyashiro et al., 2003). Cependant, le taux de recouvrement entre les ARNm candidats isolés dans les deux criblages est extrêmement faible (8 ARN). Ceci pourrait être dû au faible taux de recouvrement entre les sondes d'ADNc des puces utilisées pour l'hybridation, car seuls 17 des 80 meilleurs candidats isolés sur micropuces étaient présents sur les macropuces.

b) Les motifs ARN reconnus par FMRP

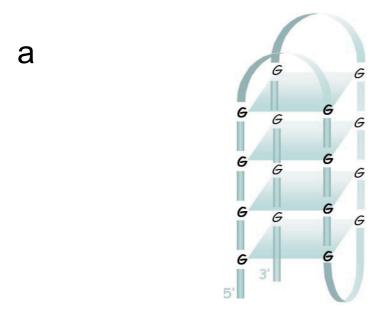
Le motif G-quartet reconnu par la boîte RGG

Le domaine RGG est capable d'interagir avec les motifs ARN G-quartets lors d'expériences d'interaction *in vitro* (Darnell et al., 2001; Schaeffer et al., 2001) et favoriserait leur stabilité (figure 13) (Zanotti et al., 2006). La boîte RGG est également nécessaire pour diriger FMRP vers les complexes ribonucléoprotéiques et les granules de stress (Mazroui et al., 2002).

L'ensemble des données révélant l'association de FMRP aux G-quartets est présenté dans la publication 1. Cet article décrit également les différents types de motifs G-quartets, la technique permettant leur d'identification par réverse transcription sur des ARN candidats ainsi que les différents rôles des G-quartets dans l'ARN et l'ADN. Finalement, l'article présente également le rôle potentiel de l'interaction FMRP/G-quartet sur la régulation des ARNm cibles de FMRP (*MAP1B*, *PSD-95*, *FGF-2*) identifiés jusqu'à présent.

Le motif "Kissing Complex" reconnu par le domaine KH2

La mutation I304N, retrouvée chez un patient présentant un syndrome de l'X fragile sévère (§ I-4-4.2-b), évoqué précédemment, a permis de supposer un rôle essentiel du



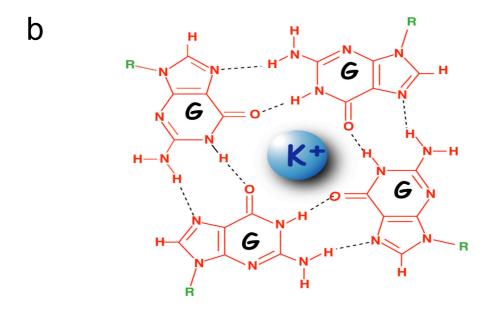


Figure 13. Structure des quartets de guanines

- a. Modèle d'une structure en quartets de guanines intramoléculaire. La structure est constituée par la superposition de plusieurs plans formés de tétrades de guanines et est stabilisée par des cations, tels que le K⁺, positionnés dans la cavité centrale. (d'après Schaeffer *et al.*, 2001)
- b. Structure plane du G-quartet. Quatre guanines forment un plan carré *via* des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen.

domaine KH2 dans les fonctions de la protéine FMRP. Jusqu'à présent, aucun ARNm lié par ce domaine n'a pu être identifié *in vivo*. Cependant, la technique de SELEX a permis d'isoler un aptamère, le "Kissing Complex" kc1, lié par le domaine KH2 (figure 14) (Darnell et al., 2005a). Ce type d'interaction "boucle-bouble" a été décrit pour la première fois dans des ARN de transfert et de nombreux ARNm polycistroniques de diverses origines (retroviruses, le retrotransposon *Ty* de levure, plusieurs procaryotes). Cette structure est formée par l'appariement de boucles complémentaires de deux motifs tige-boucle. Les "Kissing-Complex" sont impliqués dans la régulation de l'expression génique et particulièrement dans la modulation du taux de traduction de plusieurs ARNm (pour revue, (Paillart et al., 1996)). Un algorithme développé récemment permet de prédire la formation potentielle de "Kissing-Complex" entre deux séquences (Bindewald et al., 2008).

Le "Kissing-Complex" kc1, identifié par SELEX, est un ARN de 96 nucléotides constitué de deux tige-boucle séparées par une courte séquence simple-brin (figure 14a). Il est spécifiquement reconnu par le domaine KH2 de FMRP et l'interaction KH2-kc1 est dépendante de la présence de Mg²⁺ nécessaire pour la formation et la stabilisation des tiges et l'appariement des 4 nucléotides des deux boucles. Le domaine KH2 muté (I304N), incapable de reconnaître le motif kc1, empêche également l'association de FMRP avec les polyribosomes, suggérant l'importance de ce domaine pour les fonctions de FMRP (Sung et al., 2003). L'effet inhibiteur de cet aptamère sur l'association de FMRP aux polyribosomes suggère qu'une telle structure pourrait moduler l'interaction FMRP-polysomes (Darnell et al., 2005a).

Cependant, si ces analyses ont permis de vérifier l'existence d'une interaction entre le "Kissing-Complex" et FMRP *in vivo*, l'existence d'une interaction spécifique entre FMRP et des ARNm naturels reste à démontrer.

Les ARN non codants BC1/BC200

Les ARN BC1 et BC200 (Brain Cytoplasmic RNA 1 et 200) sont de petits ARN non codants de 200 nucléotides environ, spécifiquement exprimés dans les neurones humains et de rongeurs, respectivement (figure 15-16). Ils sont localisés dans les dendrites et joueraient un rôle dans la régulation de la traduction synaptique par séquestration de facteurs traductionnels (figure 16b) (Brosius and Tiedge, 2001; Tiedge et al., 1993a; Tiedge et al., 1993b). Un modèle, très controversé, suggère la régulation de la traduction d'ARNm grâce à l'interaction entre FMRP et l'ARN non codant BC1. Des expériences de co-immunoprécipitation et de retard sur gel polyacrylamide ont permis de proposer l'interaction directe entre FMRP et BC1

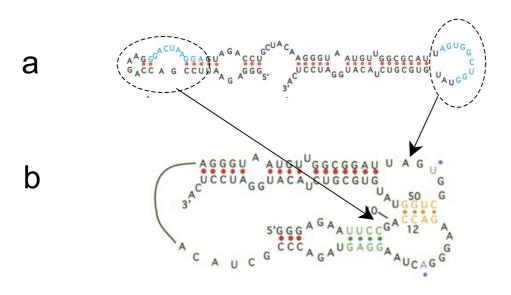
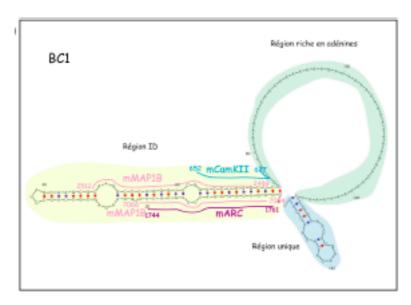


Figure 14. Structure du "kissing complex" kc1

- a. Séquence et structure secondaire du motif kc1 identifié par SELEX. Les boucles impliquées dans l'interaction boucle-boucle, suggérée par cartographie aux sondes chimiques, sont représentées en bleu.
- b. Structure tertiaire prédite de kc1 après interaction boucle-boucle. (d'après Darnell *et al.*, 2005)



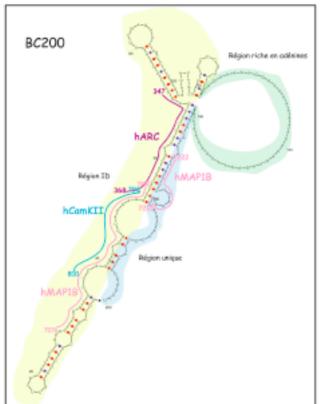
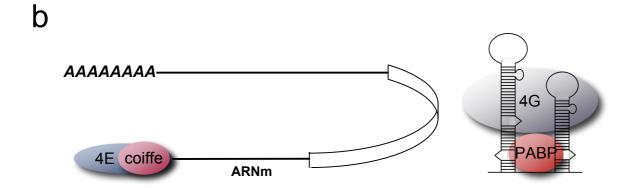


Figure 15. Structure secondaire des ARN non codants BC1 et BC200 Les trois domaines des ARN BC1 et BC200 ainsi que les régions complémentaires à trois cibles ARN potentielles (hMAP1B en rose, hCamKII en bleu et hARC en violet) de la protéine FMRP sont indiqués sur les séquences. (d'après Zalfa et al., 2005)





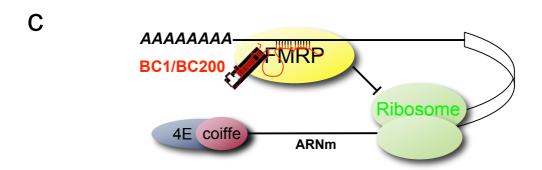


Figure 16. Deux modèles de régulation de la traduction par les ARN BC1/BC200

- a. Structure secondaire schématique des ARN BC1/BC200.
- b. Modèle d'action des ARN BC1/BC200 *via* eIF4G. Ce modèle postule que la séquence riche en adénine entre les deux tige-boucle de BC1/BC200 séquestre la PABP, et probablement d'autres facteurs de la traduction, et par conséquent inhibe la traduction (d'après Brosius *et al.*, 2001).
- c. Modèle d'action des ARN BC1/BC200 *via* FMRP. BC1/BC200 permettraient le recrutement de FMRP sur ses ARN cibles. FMRP bloquerait alors la progression des ribosomes (d'après Zalfa *et al.*, 2005).

4E = eIF4E; 4G = eIF4G; PABP = PolyA Binding Protein

(Zalfa et al., 2005; Zalfa et al., 2003). Les auteurs proposent que BC1 serait un adaptateur permettant, par appariement de séquence complémentaire avec un ARNm, le recrutement de FMRP sur certaines cibles ARNm (figure 16c). Cette interaction permettrait alors de réguler la traduction de ces ARNm localement au niveau des synapses. En effet, les ARNm dendritiques avec lesquels BC1 pourrait s'apparier semblent être traduits plus efficacement dans les souris knock-out pour FMRP que dans les souris sauvage.

Cependant, une récente étude, regroupant les résultats de différents laboratoires, a vivement critiqué le modèle selon lequel BC1 est un adaptateur entre FMRP et ses ARNm cibles (Iacoangeli et al., 2008). D'une part, l'interaction entre FMRP et BC1 semble être de nature non spécifique *in vitro* et d'autre part, la liaison de FMRP avec des ARNm cibles serait indépendante de BC1 *in vivo*. De plus, BC1 n'est pas associé aux fractions cellulaires contenant les polysomes contrairement à FMRP. L'ensemble de ces données suggère que l'interaction FMRP/BC1 est un artefact et supporte le modèle selon lequel FMRP et l'ARN BC1 seraient des régulateurs traductionnels agissant indépendamment (Iacoangeli et al., 2008).

5.2) Les principaux interacteurs protéiques de FMRP

Afin de comprendre les fonctions exactes de FMRP, les protéines associées dans les particules ribonucléoprotéiques ont été recherchées. De nombreux interacteurs susceptibles d'être impliqués dans la formation d'un ou plusieurs complexes RNP et/ou protéiques ont été identifiés (figure 17).

a) FXR1P et FXR2P

Il a été montré, par double hybride, que FMRP forme des hétérodimères avec chacune de ces deux autres protéines homologues, membres de la famille FXR: FXR1P et FXR2P (Zhang et al., 1995). Contrairement à *Fmr1*, les gènes *FXR1* et *FXR2* sont autosomiques et aucune pathologie liée à leur inactivation n'est connue. FXR1P et FXR2P sont deux protéines homologues de FMRP. Le pourcentage d'identité en acides aminés avec FMRP est de plus de 60%. Comme FMRP, ces protéines possèdent deux domaines KH, une boîte RGG, un NLS et un NES. Toutes ces similarités suggèrent que les protéines FXR1P et FXR2P pourraient compenser partiellement l'absence de FMRP chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, bien que leur expression ne soit pas augmentée (Feng et al., 1997a). Cette hypothèse

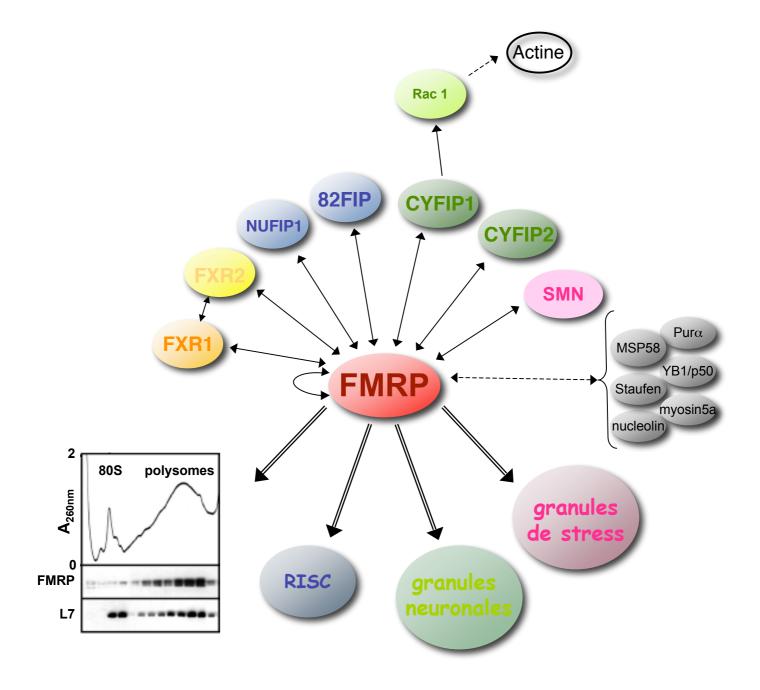


Figure 17. Réseau des différents interacteurs de FMRP

Les flèches pleines indiquent les protéines dont une interaction directe avec FMRP a été démontrée. Les flèches en pointillé indiquent les protéines avec lesquelles FMRP a été trouvée au sein de complexes. Les flèches doubles indiquent les complexes ribonucléoprotéiques ou les foci cytoplasmiques dans lesquels FMRP a été identifiée. NUFIP = Nuclear FMRP Interacting Protein; 82-FIP = 82 kDa-FMRP Interacting Protein; FXR1/2P = Fragile X Related Protein 1/2; CYFIP 1/2 = Cytoplasmic Interacting Protein; SMN = Survival of Motor Neuron; YB1 = Y-Box-binding Protein 1; MSP58 = MicroSpherule Protein 58; RISC = RNA Induced Silencing Complex.

est renforcée par l'analyse d'un modèle murin avec les gènes *Fmr1* et *FXR2* invalidés simultanément (Spencer et al., 2006). Le phénotype comportemental de ces souris est plus sévère que celui observé dans chacun des modèles knock-out simples. Toutefois, ces protéines semblent avoir acquis des fonctions distinctes. En effet, bien qu'ayant une localisation similaire à celle de FMRP dans le cerveau, elles ont une localisation différente dans les cellules musculaires et testiculaires (Tamanini et al., 1997) et dans le noyau : nucléoplasme pour FMRP et FXR1P et nucléole pour FXR2P (Tamanini et al., 1999). Chez la drosophile, dFXR est l'unique orthologue de la famille FXR des vertébrés.

b) 82-FIP, NUFIP, CYFIP1/2, Nucléoline, ...

FMRP peut également interagir avec la protéine 82-FIP (82kDa-FMRP Interacting Protein) dont les fonctions sont inconnues. Tout comme FXR1P et FXR2P, cette protéine a été identifiée par criblage double hybride (Bardoni et al., 2003a). Des tests de "GST pulldown" ont montré que 82-FIP interagit de manière spécifique avec FMRP au niveau de sa région N-terminale. Cette interaction a également été montrée *in vivo*, FMRP étant co-immunoprécipitée par un anticorps dirigé contre 82-FIP. Il a été montré que 82-FIP est localisée dans le noyau et le cytoplasme et que cette localisation est modulée en fonction du cycle cellulaire (Bardoni et al., 2003a). 82-FIP est capable, tout comme FMRP, de se lier à des séquences ARN polyG ainsi qu'aux polysomes suggérant qu'elle puisse avoir une certaine affinité pour les ARNm. Cependant, aucun motif de liaison aux ARN connu n'a été identifié dans cette protéine suggérant donc qu'elle pourrait contenir un nouveau domaine de liaison à l'ARN

L'interaction entre la protéine NUFIP (NUclear FMRP Interacting Protein) et FMRP a également été mise en évidence par criblage double hybride (Bardoni et al., 2003b). NUFIP est une protéine dont la localisation est principalement nucléaire, mais elle est capable, comme FMRP, de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cette protéine ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines de fonction connue. Cependant, elle contient un signal de localisation nucléaire ainsi que deux motifs en doigt de zinc. Elle est également capable d'interagir avec des séquences homopolymères d'ARN *in vitro* et avec les polysomes dans le cytoplasme.

Deux autres interacteurs se liant aux ARN ont également été identifiés par criblage double hybride : CYFIP1 et CYFIP2 (CYtoplasmic FMRP Interacting Protein 1/2). Ces deux protéines présentent 88% d'identité entre elles (Schenck et al., 2001). CYFIP1 a été précedemment décrite comme un interacteur de la Rho GTPase Rac1 (Kobayashi et al., 1998). CYFIP2 fait partie du complexe WAVE impliqué dans l'activation de la nucléation de l'actine (Eden et al., 2002; Kunda et al., 2003; Schenck et al., 2004).

L'existence d'une interaction directe entre FMRP et la protéine IMP1 (Insulin-like Growth Factor II mRNA binding protein), intervenant dans le transport d'ARN, a été montré en utilisant le système de complémentation de fluorescence (système BiFC ou Bimolecular Fluorescence Complementation) (Rackham and Brown, 2004). Récemment, un criblage double hybride a permis de montrer l'interaction entre FMRP et MSP58 (Microsphérule 58) qui pourrait jouer un rôle dans l'export d'ARNm hors du noyau (Davidovic et al., 2006). Enfin, la nucléoline, YB1/P50 (Y-box-binding protein 1), Pur-alpha, mStaufen et la myosine Va ont été immunoprécipités dans des complexes contenant FMRP, sans que la preuve d'une association directe avec FMRP ne soit apportée (Ceman et al., 1999; Ceman et al., 2000; Ohashi et al., 2002). La nucléoline est impliquée dans la biogénèse des ribosomes (Ginisty et al., 1998) et la protéine YB1/P50 pourrait réguler l'expression de gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel (Kohno et al., 2003). Les protéines mStaufen et myosine Va pourraient réguler le transport des polyribosomes le long des microtubules et des filaments d'actine (pour revues (Roegiers and Jan, 2000; Trybus, 2008)). La protéine Pur-alpha serait impliquée dans le transport des ARNm le long des dendrites favorisant l'interaction entre les microtubules et les ribosomes et/ou l'ARN BC1 (Kobayashi et al., 2000; Li et al., 2001a; Ohashi et al., 2000).

Récemment une interaction entre FMRP et la protéine SMN (Survival of Motor Neuron) a été identifiée dans des neurones en culture par localisation cellulaire et immunoprécipitation (Piazzon et al., 2008). SMN est essentielle dans l'assemblage du complexe snRNP U et serait impliquée dans le transport et la régulation traductionnelle des ARNm neuronaux (Kolb et al., 2007). L'interaction entre ces deux protéines suggère une relation entre l'atrophie spino-musculaire, due à la diminution du taux de SMN, et le syndrome de l'X fragile.

c) Les protéines de la voie d'ARN interférence

Finalement, plusieurs études ont montré un lien entre dFXR, orthologue de FMRP chez la Drosophile, et le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002). En isolant par immunoprécipitation le complexe mRNP contenant dFXR, outre deux protéines ribosomiques, L5 et L11, l'ARNr 5S et Dmp68 (une hélicase des ARN), la protéine Ago 2 (Argonaute 2) a été identifiée (Ishizuka et al., 2002). Par ailleurs, la purification du complexe RISC a permis d'isoler certaines protéines associées dont dFXR. L'existence d'une interaction entre dFXR et le complexe RISC semblerait renforcée par le fait que des miARN et des siARN co-immunoprécipitent avec dFXR.

L'association de FMRP au complexe RISC semble conservée chez les vertébrés car les interactions entre FMRP et eIF2C2, orthologue d'Ago2, d'une part, et Dicer, d'autre part, ont également été mis en évidence (Jin et al., 2004; Lugli et al., 2005). Toutefois, si l'interaction entre dFXR et le complexe RISC semble plus ou moins admise, le rôle de dFXR dans la régulation des ARN *via* l'activité RISC est nettement moins clair. En effet, l'inhibition de l'expression de dFXR dans la cellule ne semble pas avoir un effet important sur l'activité d'ARN interférence mesurée avec un gène rapporteur, alors que ce type d'expérience avait permis de mettre en évidence l'importance de la protéine Ago2 dans cette activité.

6. Rôles potentiels de FMRP

6.1) FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes

Les expériences de marquage cellulaire par immunofluorescence montrent que FMRP est localisée dans des granules cytoplasmiques, et qu'elle colocalise avec des structures ribosomiques notamment au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) périnucléaire (figure 17) (Feng et al., 1997b; Khandjian et al., 1996; Mazroui et al., 2002). Les tests de fractionnement cellulaire sur gradient de sucrose ont permis de montrer que FMRP est associée aux polyribosomes, et que la mutation ponctuelle I304N empêche cette association (Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997a; Khandjian et al., 1996). Cette association aux ribosomes a été observée dans de nombreux types cellulaires dont les cellules neuronales. Cette interaction dépend de la liaison FMRP-ARNm; en effet, le traitement d'un extrait

cellulaire avec de la RNAse, induisant la dégradation des ARNm et la dissociation des polysomes sans altérer la structure des ribosomes, détache FMRP des ribosomes. FMRP sédimente alors sous forme libre ou au sein de complexes ribonucléoprotéiques de faible poids moléculaire. Lorsque la dissociation des ribosomes est induite par traitement à l'EDTA, FMRP est, au contraire, associée à des fractions de polyribosomes légers sur gradient de sucrose (Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997a; Ohashi et al., 2002). Enfin, FMRP a été retrouvée au sein de complexes RNP collectés sur colonne oligodT (Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997a).

6.2) Implication dans la régulation de la traduction

a) Etudes in vitro

L'identification, par purification sur gradient de sucrose, de l'interaction entre FMRP, les ARNm et les polysomes, a constitué un premier indice majeur suggérant l'implication de FMRP dans la régulation de la traduction. Par ailleurs, il a été montré, in vitro dans des extraits de réticulocytes de lapin et d'oocytes de xénope, que FMRP inhibe la traduction (Laggerbauer et al., 2001). Lorsque FMRP est produite à partir de bactéries, cet effet semble indépendant de la nature de l'ARNm testé alors que l'utilisation d'une protéine FMRP produite en cellules d'insecte a permis de mettre en évidence une inhibition de la traduction dépendante de la nature de l'ARNm et nécessitant l'interaction entre FMRP et l'ARNm (Li et al., 2001b; Schaeffer et al., 2001). Des modifications post-traductionelles pourraient donc restreindre l'action inhibitrice de FMRP à des cibles ARNm particulières. D'autre part, la forme mutante I304N de FMRP n'a pas d'effet sur la traduction d'ARNm (Laggerbauer et al., 2001). Bien que cette protéine mutante dans le domaine KH2 conserve certaines capacités d'interaction à l'ARN dans des conditions salines physiologiques, elle semble perdre ses capacités d'homo et hétérodimérisation avec FXR1P et FXR2P (Laggerbauer et al., 2001). Le domaine KH2 de FMRP semble donc nécessaire à l'interaction avec différents partenaires protéiques et cette propriété semble requise in vitro pour la régulation de la traduction d'ARNm.

b) Etudes in vivo

L'association de FMRP avec les polysomes dans le cytoplasme, notamment au niveau du RER et des synapses, suggère fortement l'implication de FMRP dans la régulation de la traduction (Feng et al., 1997b; Khandjian et al., 1996; Weiler et al., 1997). Le traitement des cellules par l'azide de sodium bloque l'initiation de la traduction sans affecter l'élongation. Il en résulte alors une diminution des polysomes actifs, les ribosomes se détachant progressivement des ARNm traduits sans pouvoir se réassocier sur de nouveaux ARNm. Cette diminution de polysomes actifs se manifeste par une diminution au cours du temps des polysomes lourds sur gradients de sucrose et par une augmentation des ribosomes libres. Or, sous l'effet de ce traitement, la majeure partie de FMRP disparaît également des fractions lourdes (Feng et al., 1997a) suggérant l'association de FMRP aux polyribosomes en cours de traduction.

Les conséquences de l'absence de FMRP sur la traduction ont été étudiées grâce à deux méthodes de cribles à grande échelle afin d'identifier des cibles ARNm potentielles de FMRP. A l'aide de micropuces, 251 ARNm, dont le profil d'association aux polysomes est modifié dans les cellules lymphoblastoïdes de patients par rapport à celui observé dans les cellules d'individus sains, ont été identifiés (Brown et al., 2001). Seuls 14 de ces ARNm avaient été également immunoprécipités avec FMRP, ce faible taux de recouvrement pouvant être dû à l'analyse de tissus différents (cerveau versus lymphoblastes) et par le faible niveau de correspondance des oligonucléotides présents sur les micropuces utilisées dans les deux études. En l'absence de FMRP, l'association aux polysomes de 6 de ces ARNm est augmentée, alors qu'elle est diminuée pour les 8 autres. Il semblerait donc que FMRP, en fonction de l'ARNm ciblé, empêche ou favorise l'association des ARNm aux polysomes. Si l'on considère que le niveau d'association des ARNm aux polysomes reflète leur niveau de traduction, FMRP pourrait jouer *in vivo* le rôle d'inhibiteur ou d'activateur de la traduction de ces ARNm, affectant donc positivement ou négativement le niveau cellulaire des protéines.

Cependant, la démonstration claire de l'implication directe de FMRP dans la régulation de la traduction de protéines spécifiques n'a pas encore été établie. Une analyse quantitative directe par western-blot a permis de montrer que deux protéines GRK2 (G protein-coupled Receptor Kinase 2) et \(\beta DAG1 \) (Dystroglycan-Associated Glycoprotein 1), correspondant à deux des 81 ARNm cibles potentielles identifiés \(via \) la technique d'APRA (Miyashiro et al., 2003), sont plus abondantes dans le cerveau de souris sauvages que dans

celui de souris knock-out pour FMRP. Deux autres protéine, RGS5 (Regulator of G protein Signalling 5) et CDK4 (Cyclin D dependent Kinase 4), dont les ARNm ont également été identifiés lors de ce criblage, sont plus abondantes dans des extraits de synaptoneurosomes de souris sauvage que dans ceux de souris knock-out pour FMRP. Par ailleurs, la traduction des protéines Arc (Activity-Regulated Cytoskeleton associated protein), MAP1B (Microtubule Associated Protein 1B), FXR2P et α-CaMKII (α CalModuline Kinase II) pourrait être réprimée par FMRP car ces protéines sont en quantité plus importante dans des extraits de cerveaux totaux et/ou de synaptoneurosomes de souris invalidées pour le gène *Fmr1*. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que FMRP pourrait avoir un rôle simultané d'activateur et de répresseur traductionnel en fonction de la cible ARNm concernée.

Quelques approches par "gènes candidats" ont permis d'identifier des ARNm liés par FMRP et codant des protéines dont la quantité est modifiée en absence de FMRP. Pour le facteur d'élongation EF-1A (Elongation Factor 1 A) (Sung et al., 2003) et la protéine MAP1B la traduction semble inhibée au cours du développement (Lu et al., 2004).

En revanche, sous l'effet de l'activation de récepteurs au glutamate, la quantité de la protéine structurale PSD-95 (Post-Synaptique Density 95) est augmentée lorsque FMRP est exprimée, mais son niveau d'expression basal n'est pas modifié en son absence (Muddashetty et al., 2007; Todd et al., 2003; Zalfa et al., 2007). Les résultats de ces différentes études sont contradictoires. En effet, dans l'étude de Muddashetty et al., la quantité d'ARNm PSD-95 au sein des dendrites et des synaptosomes ne varie pas entre souris sauvages et Fmr1-/-, alors que la quantité d'ARNm dans les polyribosomes en cours de traduction est dérégulée dans les synaptoneurosomes de souris Fmr1^{-/-} en réponse à l'activation des récepteurs mGluR (Muddashetty et al., 2007). Ces auteurs proposent un effet sur la traduction locale. En revanche, l'étude de Zalfa et al., en montrant que la quantité globale d'ARNm PSD-95 est plus faible dans l'hippocampe et le cervelet de souris Fmr1^{-/-} comparativement aux souris Fmr1^{+/+} alors que son profil polysomal est similaire dans les extraits de cerveau de souris Fmr1^{+/+} et Fmr1^{-/-}, propose que FMRP serait impliquée dans le contrôle leur stabilité (Zalfa et al., 2007). Quoiqu'il en soit, l'interaction entre FMRP et l'ARNm PSD-95 semble indéniable in vivo au niveau des synaptoneurosomes (Muddashetty et al., 2007; Zalfa et al., 2007). L'étude de Zalfa émet l'hypothèse que la régulation de l'ARNm PSD-95 semble indépendante de la formation d'un G-quartet malgré la présence d'une séquence riche en guanines. En effet, les auteurs montrent in vitro que l'interaction entre FMRP et l'ARNm PSD-95 est indépendante de la présence de potassium alors que celui-ci stabilise les G-

quartets. Les auteurs postulent donc que FMRP serait impliquée, non dans la régulation directe du mécanisme de traduction, mais dans la stabilité de l'ARNm *PSD-95*.

III) LE SYNDROME DE L'X FRAGILE: ÉTUDE DES MODÈLES ANIMAUX

1. Contribution du modèle murin dans l'étude du rôle synaptique de FMRP

1.1) Caractéristiques générales du modèle murin

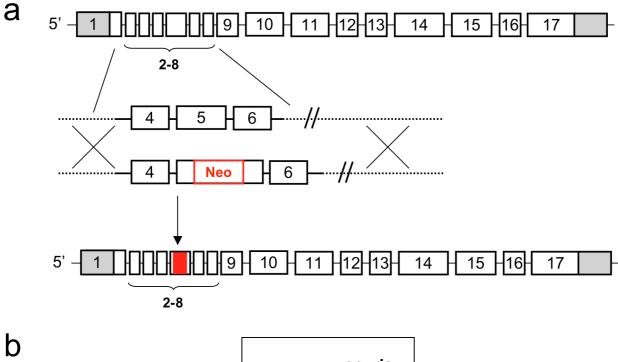
a) Création du modèle murin

La souris est un modèle animal présentant plusieurs avantages dans l'étude fonctionnelle de gènes humains

- 80% des gènes murins ont un orthologue humain dont la fonction est souvent au moins partiellement conservée du fait de la proximité phyllogénétique entre les deux espèces.
- ces animaux sont de petite taille et leur cycle de reproduction est rapide (temps de gestation 21 jours).
- le génome murin est séquencé depuis 2002.
- le développement de technique de transfert de gène permet le développement d'animaux transgéniques.

Dans le cas précis des gènes *Fmr1* humain et murin, leur forte homologie de séquence et leur grande similitude du profil d'expression suggéraient que la fonction du gène puisse être conservée entre les deux espèces.

La stratégie de knock-out a été utilisée pour créer le modèle murin du syndrome de l'X fragile (figure 18a) (Feng et al., 1997a; Khandjian et al., 1996). La copie normale du gène *Fmr1* a été remplacée, par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires, par une copie mutée dont la séquence a été interrompue par insertion du gène codant pour la néomycine dans l'exon 5. Ces cellules souches recombinées ont ensuite été injectées dans des embryons au stade blastula et transférées dans l'utérus de femelles pseudogestantes. Des femelles hétérozygotes pour la mutation ont été obtenues par croisement



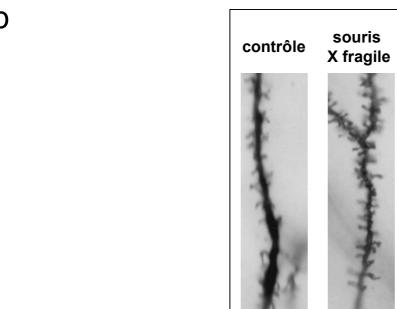


Figure 18. Modèle murin du syndrome de l'X fragile

- a. Schéma du gène *Fmr1*, montrant la stratégie d'invalidation utilisée. Les 17 exons sont représentés par des rectangles, la cassette néomycine par un rectangle rouge et les introns par des traits. L'invalidation du gène *Fmr1* est obtenue par recombinaison homologue, en induisant le remplacement de l'allèle normal par un allèle interrompu par une cassette néomycine dans l'exon 5.
- b. Les épines dendritiques des souris X fragile sont plus longues et plus nombreuses que celles des souris sauvages (adapté de Comery *et al.*, 1997).

de mâles chimères issus de ces embryons et de femelles sauvages. Le croisement des femelles hétérozygotes avec des mâles sauvages a permis l'obtention de mâles porteurs du gène muté.

Récemment, un modèle conditionnel a été élaboré en flanquant le promoteur de *Fmr1* de sites lox P (Mientjes et al., 2006). Le croisement de lignées lox P avec une lignée exprimant la recombinase Cre dans certains tissus permet de restreindre l'existence de la mutation nulle à certains types cellulaires et/ou à un temps donné.

b) Phénotype global des souris Fmr1^{-/-}

La mutation nulle introduite dans le gène Fmr1 ne reproduit pas l'expansion de triplets nucléotidiques existant chez les patients, mais aboutit au même résultat du point de vue moléculaire, c'est à dire l'absence de FMRP. Ce modèle a été validé en vertu des similarités existant entre les phénotypes des souris $Fmr1^{-/-}$ et ceux des patients.

Aucune différence majeure entre les souris knock-out et les souris sauvages n'a été observée au niveau de l'espérance de vie, du taux de fécondité et de la morphologie globale (Kooy et al., 1996), ni au niveau du poids et de la morphologie des organes vitaux (cœur, reins, rate, foie, poumons) (consortium 1994). Cependant, plus de 90% des souris *Fmr1*-/- ont un volume testiculaire supérieur à la normale reproduisant la macroorchidie trouvée chez les patients masculins (consortium 1994).

Aucune anomalie majeure n'a été observée au niveau de l'anatomie du cerveau des souris atteinte de la maladie (Kooy et al., 1999). En revanche, tout comme chez les patients, les neurones corticaux et hippocampaux de ces souris présentent des épines dendritiques surnuméraires, plus longues et plus fines (figure 18b) (Comery et al., 1997; Grossman et al., 2006). Cette caractéristique phénotypique serait à l'origine du retard mental chez les patients et sa présence chez la souris pourrait servir de base à la compréhension des bases moléculaires du syndrome.

La réalisation de tests comportementaux et moteurs a permis de montrer que les souris présentent des signes d'hyperactivité, qu'elles sont sujettes à des crises épileptiques induites par des stimuli sonores ou par stimulation des récepteurs mGluRI de l'hippocampe et qu'elles présentent des troubles de mémorisation et d'apprentissage (consortium 1994, (Chen and Toth, 2001; Chuang et al., 2005; Musumeci et al., 2000). Afin de tester leur mémoire à court-terme et leur capacité à se repérer spatialement, les souris ont été soumises au test de la piscine de Morris. Ce dispositif comporte une piscine d'eau opaque dans laquelle est

immergée une plateforme sur laquelle la souris peut s'agripper. Les souris *Fmr1*^{-/-} mémorisent l'emplacement de la plateforme aussi facilement que les souris sauvages. En revanche, lorsque la position de la plateforme a été modifiée, les souris *Fmr1*^{-/-} présentent des difficultés à trouver son nouvel emplacement et à mémoriser ce changement (consortium 1994, (Van Dam et al., 2000). Ce type d'altération proviendrait de dysfonctionnements des circuits de la mémoire et de l'apprentissage au niveau de l'hippocampe.

1.2) Introduction aux bases de la mémoire

a) Définition

L'apprentissage est un processus actif d'acquisition de savoir-faire, c'est-à-dire de pratiques, de connaissances, compétences, d'attitudes ou de valeurs culturelles, par l'observation, l'imitation, l'essai, la répétition, la présentation. Il permet la conservation des informations acquises, des états affectifs, et des impressions qui sont, en retour, capables d'influencer le comportement. L'apprentissage requiert un remaniement constant des structures cérébrales et constitue la première étape du processus de mémorisation. La mémoire correspond au stockage des informations et, subjectivement, aux souvenirs personnels.

La mémoire peut-être subdivisée en trois composantes selon l'importance de la phase d'apprentissage et la durée de stockage des informations :

- la mémoire sensorielle qui repose sur la rétention d'informations perçues par les systèmes sensoriels pendant un temps extrêmement court (quelques millisecondes).
- la mémoire à court terme qui correspond au maintien pendant quelques minutes d'un nombre limité d'éléments stockés grâce à l'attention que le sujet leur a portée.
- la mémoire à long terme (MLT) conserve à la fois les informations correspondant aux faits récents, encore fragiles, et anciens, consolidés au fur et à mesure des processus d'association. En pratique, la MLT ne connaît pas de limite de capacité ou de durée de mémorisation.

b) Plasticité des réseaux neuronaux ou bases cellulaires de la mémoire.

Au niveau cellulaire, la mémoire repose sur l'activation, lors de l'apprentissage, et sur la stimulation, lors de la restitution, de réseaux de neurones "précablés". Ces réseaux ne sont,

en effet, pas figés, mais évoluent en fonction des phénomènes d'apprentissage, de consolidation, de restitution et d'oubli. L'un des supports cellulaires associés au remodelage de ces réseaux est la plasticité synaptique. L'hypothèse du lien entre la mémorisation et la plasticité synaptique a été évoquée pour la première fois en 1949 (Hebb, 1949) constituant une séduisante explication cellulaire des phénomènes comportementaux tels que le classique (Pavlov, 1927). Cette conditionnement pavlovien hypothèse a été expérimentalement en 1973, l'activation répétitive des synapses hippocampaux induisant le renforcement synaptique pendant plusieurs heures voire plusieurs jours (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Lomo, 1973). 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 existés entre les neurones.

Il existe deux grandes formes de plasticité synaptique, la potentialisation à long terme (LTP, Long Term Potentiation) et la dépression à long terme (LTD, Long Term Depression. La LTP est un processus de renforcement synaptique, déclenchée à la suite de stimulations répétées du neurone post-synaptique (Bear and Malenka, 1994; Bliss and Collingridge, 1993). La LTP permet une augmentation de l'amplitude de la réponse post-synaptique : suite aux modifications associées à ce type de plasticité synaptique, une stimulation unique du neurone pré-synaptique suffit à déclencher une réponse intense qui perdure plusieurs heures au niveau du neurone post-synaptique. La LTD est un phénomène complémentaire, qui conduit à la mise sous silence de la synapse. Elle pourrait permettre de rétablir un fonctionnement normal au niveau d'une synapse potentialisée par la LTP. Elle jouerait un rôle actif dans la mise en mémoire d'informations (Ito, 2001).

c) Les bases moléculaires de la mémoire : les récepteurs au glutamate.

Les récepteurs au glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central et intervient au niveau des circuits neuronaux de la mémoire (Fonnum, 1984). Il intervient sur les récepteurs ionotropiques, canaux ioniques dont l'ouverture est déclenchée par la fixation du ligand, et les récepteurs métabotropiques, couplés à une protéine G et induisant une dépolarisation par activation d'une cascade de messagers secondaires.

Trois classes de récepteurs ionotropiques ont été définies selon le seuil limite de voltage nécessaire à leur activation, selon leur distribution dans le cerveau et selon leur

sensibilité aux différents agonistes et antagonistes du glutamate (pour revue, (Ozawa et al., 1998). Ces récepteurs canaux sont désignés selon le nom de leur agoniste principal :

- les récepteurs NMDA (activés par le N-méthyl-D-aspartate), canaux perméables aux ions potassium, sodium et calcium.
- les récepteurs AMPA (activés par le α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate), canaux perméables aux ions sodium et potassium.
- les récepteurs kaïnate (activés par le kaïnate) perméables aux ions potassium, sodium et calcium.

Les récepteurs métabotropiques au glutamate comportent sept domaines transmembranaires. La fixation de glutamate sur ces récepteurs induit une modification de leur conformation, déclenchant l'activation de protéines G (protéines se liant au GTP). Il existe plusieurs récepteurs métabotropiques répartis en trois groupes en fonction de leur homologie de séquence. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 constituent le groupe 1 des récepteurs métabotropiques au glutamate.

Mécanismes moléculaires d'induction de la LTP

L'utilisation d'antagonistes spécifiques a permis d'établir l'implication des récepteurs NMDA dans la LTP (figure 19) (Morris et al., 1986). Leur activation déclenche l'entrée d'ions Ca²⁺ à partir du milieu extracellulaire. Les ions Ca²⁺ sont des médiateurs essentiels dans le renforcement synaptique puisque la LTP est bloquée par la réduction de leur concentration extracellulaire (Lynch et al., 1983). Les ions Ca²⁺ activent plusieurs cascades de protéines kinase impliquées dans le maintien de la LTP en se fixant en particulier sur la proteine CaMKII. Ceci favorise l'insertion de récepteurs AMPA additionels dans la membrane des extrémités post-synaptiques par exocytose d'endosome constituant des réserves de récepteurs AMPA (figure 20). Ces récepteurs sont stabilisés grâce à leur interaction avec des protéines, telles que PSD-95, dont le niveau semble important dans le contrôle du nombre de récepteurs AMPA (Kim and Sheng, 2004; Montgomery et al., 2004). Il y a alors des changements structuraux tels que l'augmentation de la taille des extrémités postsynaptiques et donc des épines élargies de manière permanente. Le maintien de ces changements dépend de la synthèse protéique dendritique locale. Les épines dendritiques contiennent des polyribosomes, les facteurs de traduction, les protéines de liaison à la queue poly(A), des micro-ARN (par exemple miR-134) et des petits ARN localisés spécifiquement dans le cerveau comme l'ARN BC1. L'existence de traduction locale "synaptique" a effectivement été observée dans les fractions synaptosomales ou les dendrites physiquement

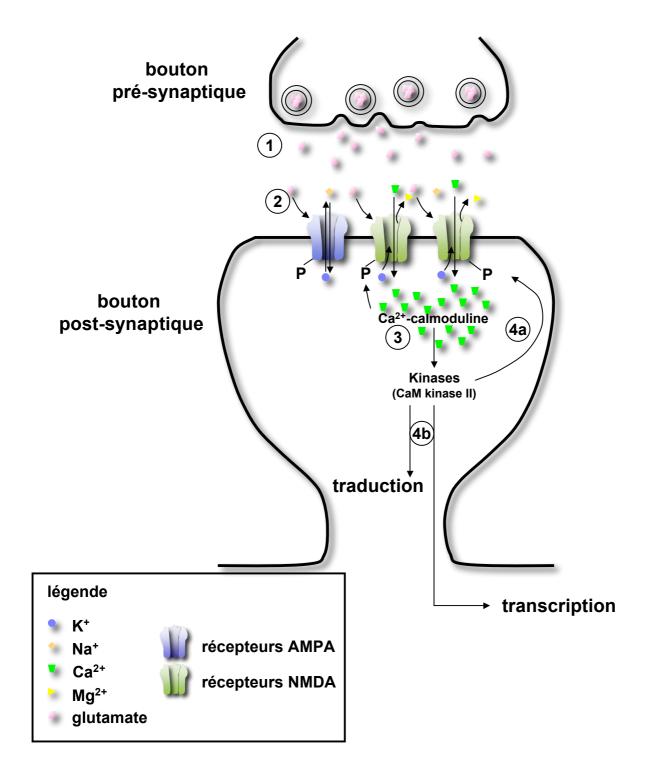


Figure 19. Mécanisme moléculaire de la potentialisation à long terme (LTP = Long Term Potentiation) dépendante des récepteurs au glutamate

1- Libération importante de glutamate par le bouton pré-synaptique induisant la dépolarisation de la membrane post-synaptique. 2- Stimulation des récepteurs post-synaptiques par le glutamate et ouverture des canaux ioniques associés aux récepteurs. 3- Augmentation transitoire intracellulaire de la concentration en calcium qui induit l'activation d'un ensemble de protéines kinases participant à la transmission des signaux dans la cellule. 4- Ces kinases déclenchent 2 types de mécanismes : 4a. la phosphorylation d'autres protéines en particulier celle des récepteurs AMPA et NMDA ce qui augmente leur sensibilité ; 4b. l'activation des phénomènes de transcription et de traduction.

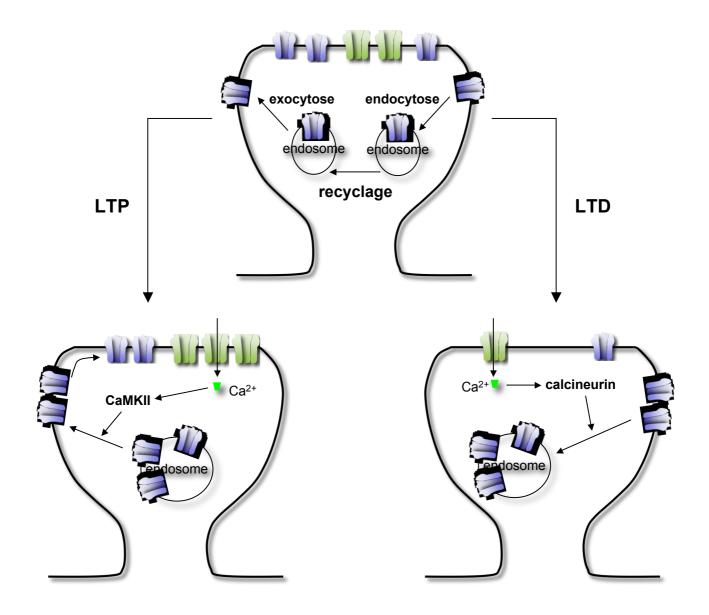


Figure 20. Modèle moléculaire du recyclage des récepteurs AMPA pendant les phénomènes de LTP et LTD

A l'état basale, les récepteurs sont recyclés entre la membranes plasmique et les endosomes intra-synaptiques par endocytose et sont recrutés à la membrane par exocytose. Les récepteurs sont dirigés à la membrane post-synaptique par mouvements latéraux où ils sont retenus par les protéines telles que PSD-95.

A la suite de LTP, la quantité de récepteurs AMPA augmente à la surface plasmique par exocytose et les récepteurs sont stabilisés grâce à un processus impliquant la protéine CaMKII.

A la suite de LTD, la quantité de récepteurs diminue par endocytose lors d'un mécanisme impliquant le Ca²⁺ et des protéines phosphatases.

séparées du corps cellulaire (Rao and Steward, 1991; Schratt et al., 2006; Torre and Steward, 1992; Weiler and Greenough, 1993). La traduction locale, en permettant aux neurones de médier très rapidement une réponse post-synaptique aux signaux transmis par les extrémités pré-synaptiques, représenterait la base de la plasticité synaptique. Cette hypothèse est confirmée par la relocalisation des polyribosomes depuis les prolongements vers les épines dendritiques après l'induction de la LTP (Ostroff et al., 2002).

Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 pourraient jouer un rôle dans l'induction de la LTP en stimulant la synthèse protéique localement au niveau des synapses. En effet, les souris inactivées pour le gène *mGluR5* présentent des altérations de la LTP (Lu et al., 1997). De plus, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs mGluR, le 2-méthyl-6-(phenyethynyl)-pyridine (MPEP), empêche la synthèse protéique nécessaire à la LTP (Francesconi et al., 2004).

Mécanismes moléculaires d'induction de la LTD

La LTD est également induite par l'activation des récepteurs NMDA et mGluR de groupe 1 également relayée par une augmentation de la concentration en Ca²⁺ dans la terminaison post-synaptique mais de manière plus modérée que pour la LTP. La LTD est médiée par une diminution des récepteurs AMPA à la surface des boutons post-synaptiques due à leur endocytose et relayée par des cascades de signalisation. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'endocytose des récepteurs AMPA sont encore mal compris. Il est proposé que les récepteurs AMPA se dissocient des protéines d'amarrage PSD et se déplacent latéralement sur le bord des extrémités post-synatiques où ils sont alors internalisés. De même que pour la LTP, la LTD dépend d'une synthèse protéique rapide dans les dendrites (Huber et al., 2000).

- 1.3) Implication de FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique : le modèle des récepteurs au glutamate
 - *a) Mise en évidence d'altération de la plasticité synaptique dans le cerveau des souris* Fmr1^{-/-}

Des analyses électrophysiologiques ont été conduites dans plusieurs régions du cerveau impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage afin de détecter d'éventuelles altérations des phénomènes de plasticité synaptique en absence de FMRP.

La LTP, dépendante de la synthèse protéiques, n'est pas modifiée dans l'hippocampe de souris mutantes (Godfraind et al., 1996; Huber et al., 2002; Paradee et al., 1999). En revanche, l'amplitude de la LTP est plus faible lorsqu'elle est induite par des stimuli tétaniques au niveau du cortex (Li et al., 2002).

La forme de LTD dépendant de synthèse protéique, induite par la stimulation à basse fréquence des neurones est augmentée dans des tranches d'hippocampe de souris *Fmr1*-/- (Huber et al., 2002). L'ajout de DHPG induit une réponse correspondant à une dépression à long terme dont l'intensité est augmentée en absence de FMRP.

b) FMRP et les récepteurs mGluR : partenaires dans la régulation de la traduction synaptique

Dans les neurones, des analyses de microscopie électronique ont permis de montrer que FMRP est localisée dans les dendrites en particulier dans les épines dendritiques (Feng et al., 1997b). Cette localisation cellulaire dans les neurones suggérait qu'elle puisse jouer un rôle dans plasticité synaptique (figure 21). Cette hypothèse a été renforcée par plusieurs résultats montrant que la synthèse de FMRP augmente localement au niveau des synapses en réponse à l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate (Antar et al., 2004; Feng et al., 1997b; Weiler et al., 1997). En effet, la stimulation de ces récepteurs par du DHPG (DiHydroxyPropoxymethylGuanine) déclenche la synthèse protéique en induisant l'association rapide de certains ARNm, dont *Fmr1*, aux polyribosomes au niveau des synapses (Antar et al., 2004; Feng et al., 1997b). FMRP est également présente dans les granules neuronaux à ARN dont la proportion augmente dans les dendrites (Antar et al., 2005; Kanai et al., 2004). Cette proportion diminue dans les synapses de neurones hippocampaux en réponse à une dépolarisation induite par du chlorure de potassium ou par des antagonistes des récepteurs mGluR.

Par ailleurs, plusieurs données indiquent que FMRP semble impliquée dans la régulation de la synthèse d'ARNm en réponse à la stimulation des récepteurs mGluR. En effet, le taux de synthèse protéique induit par le DHPG est moins important dans les préparations de synaptoneurosomes de souris knock-out pour *Fmr1* que dans les préparations de souris sauvage (Greenough et al., 2001). En plus de *Fmr1*, d'autres ARNm dendritiques tels que *MAP1B*, *PSD-95*, *APP* ou *Arc* sont des cibles de FMRP traduites en réponse à l'activation des récepteurs au glutamate (Hou et al., 2006; Sung et al., 2003; Todd et al., 2003; Westmark and Malter, 2007; Zalfa et al., 2007) suggérant un lien fonctionnel entre

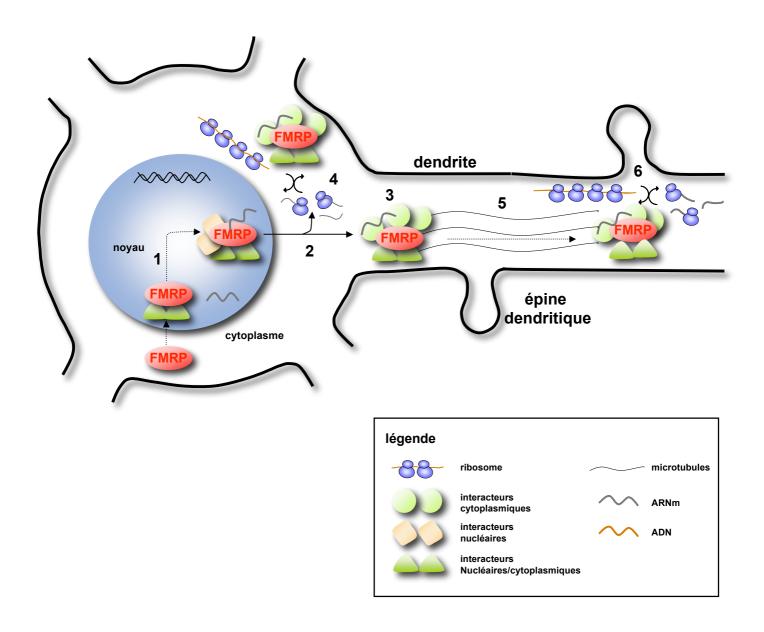


Figure 21. Modèle du rôle neuronal de FMRP

FMRP fait partie de complexes ribonucléoprotéiques dans le noyau (1) et/ou le cytoplasme (3). Au sein de ces complexes, FMRP pourrait réguler l'export d'ARNm cibles du noyau vers le cytoplasme (2) ou le long des dendrites (5), et leur traduction en s'associant aux polyribosomes dans le cytoplasme (4) et au niveau synaptique (6). (d'après Bagni and Greenough, (2005))

FMRP et les récepteurs mGluR. Les résultats d'études réalisées sur des souris Fmr1^{-/-}, suggèrent que FMRP puisse jouer le rôle dans la régulation traductionnelle de ces ARNm. En effet, dans les neurones corticaux de souris Fmr1^{-/-}, la traduction de la protéine PSD-95, normalement augmentée en réponse au DHPG, reste à un niveau basal (Todd et al., 2003). et la quantité de la sous-unité mGluR1 des récepteurs AMPA est plus faible (Li et al., 2002). De plus, l'augmentation, dépendante de FMRP, des protéines CaMKII et MAP1B a été observée après activativation des récepteurs au glutamate (Davidkova and Carroll, 2007; Muddashetty et al., 2007). Deux études récentes ont permis l'identification d'Arc comme protéine dont la synthèse est induite par l'activation des mGluR1/5, apportant le premier exemple d'un lien direct entre la synthèse protéique rapide et la LTD (Park et al., 2008; Waung et al., 2008). FMRP serait impliquée dans l'augmentation d'Arc, médiée par les mGluR. En effet, dans les neurones hippocampaux de souris Fmr1^{-/-}, la synthèse rapide d'Arc est perturbée, et, dans les souris double knock-out Arc/FMRP, la LTD médiée par les mGluR est réduite (Park et al., 2008). En revanche, la LTD dans les souris Fmr1^{-/-} est comparable à celle induite dans les souris sauvages. Ces données suggèrent qu'Arc, mais aussi un (d'autres) mécanisme(s), est (sont) impliqué(s) dans l'altération de la LTD des souris Fmr1^{-/-}. Les neurones Fmr1^{-/-} présentent un nombre réduit de granules d'ARN (Aschrafi et al., 2005). La répression traductionnelle médiée par FMRP dans les granules permettrait d'éviter une expression protéique inappropriée durant le transport dendritique et de stabiliser certains ARNm, comme PSD-95 (Zalfa et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats suggèrent un lien fonctionnel entre FMRP et les récepteurs au glutamate dans la régulation traductionnelle impliquée dans le contrôle rapide et transitoire d'ARNm essentiels dans la plasticité synaptique. Déterminer quel est le rôle exact de FMRP dans la régulation de ces ARNm cibles en condition basale ou de stimulation neuronale reste un point critique de la compréhension des fonctions neuronales de FMRP.

1.4) Rôle des récepteurs GABA dans le syndrome de l'X fragile

Plusieurs évidences indiquent l'implication des récepteurs GABA (Gamma Amino-Butiric Acid) dans le syndrome de l'X fragile. En effet, une réduction de l'expression de sept des 17 sous-unités des récepteurs GABA chez les souris $Fmr1^{-/-}$ (Gantois et al., 2006) et des trois sous-unités GABA de drosophiles $dFXR^{-/-}$ (D'Hulst et al., 2006) a été observée. Chez les souris $Fmr1^{-/-}$, la morphologie des régions interneuronales impliquées dans la libération du GABA est altérée (Selby et al., 2007) et l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs GABA a

permis d'observer la diminution de la densité des épines dendritiques des neurones *Fmr1*^{-/-} (Segal et al., 2003).

1.5) Le transport des granules d'ARN jusqu'aux synapses

La synthèse protéique post-synaptique nécessite la présence d'ARNm à la base des épines dendritiques. Les ARNm sont transportés dans les prolongements neuronaux jusqu'aux épines dendritiques le long des réseaux de microtubules au sein de granules d'ARN (RNA granules). Les granules d'ARN sont constitués de protéines de liaison aux ARN, de facteurs de traduction et des sous-unités ribosomales. Parmi les protéines de liaison aux ARN trouvées dans les granules d'ARN sont présentes FMRP, FXR1P, FXR2P et MSP58. La fusion de FMRP avec la GFP (Green Fluorescent Protein) a permis de visualiser les mouvements, bidirectionnels et dépendants des microtubules, des granules contenant FMRP dans des neurones (De Diego Otero et al., 2002). Une autre étude, dont l'objectif était d'analyser l'importance de la kinesin 5 dans le transport des granules d'ARN, a également identifié plusieurs protéines dont FMRP, FXR1P, FXR2P mais aussi Pura, Staufen et un certain nombre d'ARNm (Kanai et al., 2004). Plus récemment, Davidovic a montré l'interaction directe entre FMRP et la kinesin KIF3C (KInesin Family member 3C), spécifique des neurones, suggérant que FMRP est un adaptateur moléculaire entre les granules d'ARN et KIF3C (Davidovic et al., 2007). Une autre étude a montré l'implication directe de FMRP dans le transport de plusieurs ARNm le long des dendrites via son interaction avec la kinesin, KIF5 (Dictenberg et al., 2008). Les auteurs ont observé, dans les cellules knock-out pour FMRP, un défaut de localisation des ARNm suivant l'activation des récepteurs au glutamate et l'altération du transport d'ARNm cibles de FMRP importants pour les fonctions synaptiques. Associés aux données décrivant une diminution de la quantité de granules d'ARNm (Aschrafi et al., 2005), ces travaux supportent un rôle essentiel de FMRP dans la formation et le transport des granules d'ARN.

L'ensemble de ces résultats souligne un rôle critique de FMRP dans la transmission interneuronale du signal induit par l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate, en contrôlant la traduction locale synaptique et/ou la localisation d'ARNm au niveau synaptique.

1.6) Le modèle de pathologie synaptique des récepteurs au glutamate

Comment FMRP participe à la régulation traductionnelle en réponse à la stimulation des mGluR et participe ainsi à certaines formes de LTP et LTD ?

Les mGluR activent la traduction avec stimulation d'une cascade de signalisation qui induit la phosphorylation de facteurs d'initiation de la traduction ou stimulent la synthèse de facteurs additionnels (Ceman et al., 2003). FMRP serait une des protéines traduites lors de ces processus, et exercerait également un contrôle sur les synthèses protéiques en cours. Des variations de son niveau d'expression, de ses modifications post-traductionnelles (phosphorylation), de son recrutement dans des mRNP ou des granules à ARN dans lesquels la traduction est inactive, pourraient permuter ses fonctions de répresseur à activateur traductionnel. L'activation des mGluR conduit à une stimulation de la phosphatase PP2A qui déphosphoryle rapidement FMRP favorisant la traduction de ses ARNm cibles (Narayanan et al., 2007). L'absence de FMRP pourrait également altérer directement les fonctions des mGluR. En effet, dans les souris Fmr1^{-/-} la localisation de mGluR5 est réduite au niveau des extrémités post-synaptiques et son interaction avec la protéine Homer est altérée, la découplant ainsi de la machinerie traductionnelle (Giuffrida et al., 2005; Ronesi and Huber, 2008). L'activation des mGluR de type 1 induit l'internalisation des récepteurs AMPA à l'origine de la LTD. Dans les souris Fmr1^{-/-} la LTD est renforcée et persiste malgré la présence d'inhibiteurs de synthèse protéique (Hou et al., 2006; Nosyreva and Huber, 2006) et le nombre des récepteurs AMPA est réduit de la membrane (Nakamoto et al., 2007). FMRP pourrait inhiber la synthèse de protéines intervenant dans l'internalisation des récepteurs AMPA au niveau de la membrane plasmique post-synaptique, et diminuer de fait l'amplitude de la dépression induite. La dérégulation ou l'instabilité des ARNm associés à FMRP et impliqués dans l'endocytose des récepteurs AMPA tels que MAP1b, APP, PSD-95 ou Arc pourrait expliquer l'altération de la LTD (Chowdhury et al., 2006; Davidkova and Carroll, 2007; Nosyreva and Huber, 2006; Westmark and Malter, 2007; Zalfa et al., 2003).

Dans le cas de la LTP, FMRP semble au contraire activer la synthèse de protéines, telles que la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, et participerait de ce fait à la potentialisation de la synapse. La potentialisation à long terme influence la morphologie et le nombre de contacts synaptiques (Hering and Sheng, 2001; Toni et al., 1999). L'altération de ces formes de plasticité synaptique en absence de FMRP pourrait donc conduire à une maturation anormale des synapses et expliquer les anomalies quantitatives et qualitatives des épines dendritiques observées dans le cerveau des souris *Fmr1*-/- et celui des patients.

L'ensemble de ces résultats suggère que FMRP puisse jouer le rôle frein à la plasticité synaptique dépendante de la synthèse protéique et de la stimulation des récepteurs aux glutamate. Une récente étude a montré que FMRP régule la LTD et la synthèse protéique en réponse à l'activation des récepteurs muscariniques à acétylcholine couplés aux protéines G suggérant que le rôle de FMRP s'étendrait au-delà des récepteurs mGluR.

2. Le modèle drosophile : lien entre FMRP et le cytosquelette d'actine

2.1) Caractéristiques générales du modèle drosophile

a) La protéine dFXR

Chez la drosophile, dFXR constitue le seul orthologue des trois protéines de la famille FXR de mammifères. L'homologie de séquence entre dFXR et les protéines FXR est élevée. En effet, le taux de similarité entre dFXR et FMRP en particulier est de 56% (Wan et al., 2000; Zhang et al., 2001b).

dFXR est exprimée de manière ubiquitaire au cours des premiers stades du développement (Schenck et al., 2002; Wan et al., 2000). Au fur et à mesure du développement, le niveau d'expression du gène devient plus important dans le cerveau, la chaîne nerveuse centrale, les muscles, et les testicules. Dans les cellules, dFXR est localisée dans le cytoplasme, les prolongements axonaux et dendritiques des neurones.

dFXR comporte deux domaines KH, une boîte RGG et des signaux d'export et de localisation nucléaire. Certaines caractéristiques fonctionnelles des protéines FXR sont également conservées chez la drosophile. dFXR se lie à l'ARN et interagit avec dCYFIP et dNUFIP, les orthologues des protéines CYFIP1/2 et NUFIP de mammifère (Schenck et al., 2003). Enfin, dFXR pourrait réprimer la traduction d'ARNm *via* la machinerie RISC (§ II-5-5.2-c) (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002).

b) Création du modèle drosophile

Dans le cas du syndrome de l'X fragile, les avantages de l'utilisation de la drosophile comme modèle sont :

- l'homologie de séquence et la conservation de certaines caractéristiques fonctionnelles suggérant que FMRP et dFXR puissent jouer des rôles similaires dans la cellule.
- l'existence d'un orthologue unique de la famille FXR simplifiant l'étude fonctionnelle de FMRP.
- de manière plus générale, le développement du système nerveux est bien connu chez la drosophile.

Plusieurs lignées mutantes de drosophile ont été créées par insertion d'un élément P dans la séquence du gène *dFmr1* (Zhang et al., 2001b). Plusieurs lignées ont été générées par insertion de l'élément P dans la région 5' non traduite de *dFmr1* et représentent des mutants knock-out pour dFXR. Une lignée comportant une mutation ponctuelle I307N dans le domaine KH2, équivalente à la mutation I304N de FMRP, a été établie.

c) Caractéristiques phénotypiques générales des drosophiles dFmr1-/-

Les mutants $dFmrI^{-/-}$ ont une espérance de vie similaire à celle des drosophiles sauvages. Elles présentent une augmentation du volume testiculaire, analogue à celle observée chez les mammifères, associée à une diminution du taux de fécondité (Zhang et al., 2004). D'un point de vue comportemental, les mâles $dFmrI^{-/-}$ perdent la capacité d'effectuer correctement leur parade nuptiale (McBride et al., 2005) et présentent un rythme circadien anormal (Dockendorff et al., 2002; Morales et al., 2002). Si l'anatomie du cerveau est globalement normale, des défauts ont été observés au niveau de la croissance, du guidage et du branchement des axones impliqués dans le contrôle de l'éclosion et de l'activité locomotrice (Dockendorff et al., 2002; Morales et al., 2002). Les synapses des jonctions neuromusculaires sont anormalement larges chez les mutants $dFmrI^{-/-}$ rappelant celles observées au niveau des épines dendritiques chez les mammifères (Schenck et al., 2003; Zhang et al., 2001b).

2.2) Etude du modèle drosophile

a) dFXR participe à la réorganisation du cytosquelette de microtubules

Les microtubules constituent un réseau utilisé pour le transport intracytoplasmique d'organites, d'ARN et de protéines. Dans les neurones en particulier, ces filaments forment des "rails" permettant l'acheminement de différents constituants cellulaires jusqu'aux

extrémités axonales et dendritiques (Goldstein and Yang, 2000). MAP1B fait partie de la famille des protéines MAP (Microtubules Associated Protein) dont le rôle est de stimuler la formation et la stabilité des microtubules.

Chez la drosophile, *dFmr1* régulerait la mise en place des réseaux axonaux : l'analyse du phénotype des mutants *dFmr1*-- ou la surexpression de dFXR révèlent qu'elle contrôle le guidage des axones et inhibe leur extension et leur ramification (Morales et al., 2002). L'absence de dFXR conduit a une augmentation de la taille et du degré de ramification des synapses alors que sa surexpression aboutit à l'effet inverse. Ces anomalies sont de même nature, mais inverses, à celles observées en absence de la protéine Futsch, l'orthologue de MAP1B chez la drosophile. L'absence de Futsch s'accompagne d'une diminution de la taille et de la complexité des synapses, et d'un raccourcissement des dendrites (Zhang et al., 2001b). L'effet de dFXR sur l'architecture du réseau neuronal s'effectuerait *via* Futsch puisque dFXR semble réprimer sa traduction.

Ce mécanisme semble conservé chez les mammifères puisque la stabilité du réseau de microtubules est accrue dans des neurones *Fmr1*^{-/-}. Ce défaut pourrait être expliqué par un taux anormalement élevé de la protéine MAP1B, dont la traduction serait inhibée par FMRP au cours du développement (Lu et al., 2004).

dFXR et FMRP pourraient contrôler indirectement l'architecture et la dynamique des filaments de microtubules en régulant respectivement le niveau d'expression des protéines Futsch et MAP1B. Ce contrôle pourrait expliquer les défauts de morphogenèse synaptique observés en absence de dFXR. En revanche, la modification de l'architecture et de la dynamique du réseau de microtubules en absence de FMRP permet difficilement d'expliquer les anomalies observées au niveau des épines dendritiques dont la morphologie dépend essentiellement du réseau d'actine.

b) dFXR module le cytosquelette d'actine au niveau des synapses

Les filaments d'actine forment un réseau bidimensionnel dense sous la membrane plasmique. Cette charpente d'actine est labile et sa réorganisation dynamique permet à la cellule de se diviser, de changer de forme, de se déplacer ou d'émettre des projections membranaires comme les axones ou les dendrites.

L'interaction FMRP-CYFIP1-Rac1 suggère un autre mécanisme de régulation de la plasticité synaptique par FMRP. Rac1 est une protéine de la famille des Rho GTPase (Ras Homolog Guanosines TriPhosphatase) dont le fonctionnement repose sur l'alternance entre

une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Sous leur forme active, les Rho GTPases stimulent différentes cascades de signalisation intracellulaire. Rac1 contrôle, non seulement la mise en place et la maturation des épines dendritiques au cours du développement, mais également leur remodelage au cours du temps en régulant le cytosquelette d'actine (Nakayama et al., 2000). Les protéines CYFIP, identifiées comme interacteurs de FMRP, sont des protéines se liant à Rac1. En effet, CYFIP1/2 font partie du complexe WAVE/SCAR qui active le complexe de nucléation de l'actine, ARP 2/3 (Actin Related Protein 2/3), en réponse à différents stimuli (Eden et al., 2002; Schenck et al., 2004). Chez la drosophile, dCYFIP, seul orthologue de CYFIP1 et 2, se lie à dFXR d'une part et dRac1 d'autre part (Schenck et al., 2003). En absence de dFXR, dRac1 est constitutivement active (Schenck et al., 2003; Tashiro and Yuste, 2004). L'interaction entre FMRP et la voie de Rac1 a également été mise en évidence dans un modèle de fibroblastes murins (Castets et al., 2005). Dans ces cellules, le remodelage de l'actine induit par Rac1 est altéré en absence de FMRP. Le mécanisme par lequel FMRP pourrait agir sur la voie Rac n'est pas encore compris. Par ailleurs, les auteurs ont observé, dans les fibroblastes Fmr1^{-/-}, comparativement aux fibroblastes sauvages, que le degré de phosphorylation de la cofilin, un médiateur de la voie Rac1, est plus faible. Parallèlement, l'expression de la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 2A (PP2Ac), phosphatase proposée de la cofilin phosphorylée, est augmentée. Cependant, PP2A ne serait pas la phosphatase majeure de la P-cofilin.

3. Apport des modèles animaux dans la recherche d'un traitement du syndrome de l'X fragile

Les modèles souris et drosophile du syndrome de l'X fragile, décrits précédemment, ont permis de tester l'efficacité de molécules sur le rétablissement du phénotype sauvage. L'ensemble des données décrites précédemment (§ III-1-1.3) suggère que FMRP et les mGluR du groupe 1 fonctionneraient en opposition et qu'en absence de FMRP, la régulation de la synthèse protéique dépendante des mGluR est altérée induisant le syndrome de l'X fragile. Sur la base de ces éléments, il a été proposé que l'inhibition des récepteurs au glutamate, avec des molécules antagonistes comme le MPEP, corrige les symptômes des patients X fragile. L'attrait pour la théorie des mGluR vient de sa simplicité et de son implication thérapeutique potentielle, et la régulation de la cascade des mGluR pourrait corriger plusieurs symptômes du syndrome de l'X fragile. Cependant, jusqu'à aujourd'hui, les évidences majeures en faveur de cette théorie sont indirectes (McBride et al., 2005). Il a été

montré que l'administration intense de MPEP, antagoniste des récepteurs au glutamate mGluR5, aux souris Fmr1^{-/-} corrige leur phénotype (Chuang et al., 2005; de Vrij et al., 2008; Yan et al., 2005). Une étude récente a montré le lien phénotypique direct entre FMRP et les mGluR, une régulation négative chronique des mGluR du groupe 1 corrigeant l'altération développementale des souris Fmr1^{-/-} (Dolen and Bear, 2008). Chez les souris Fmr1^{-/-}, la réduction de 50% des mGluR5, par stratégie génétique, réduit la LTD (augmentée chez les individus Fmr1^{-/-}), rectifie la synthèse protéique basale, restaure la densité des épines dendritiques des neurones corticaux et la taille testiculaire et améliore les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage (Dolen and Bear, 2008). Cependant, bien que ces résultats supportent la théorie selon laquelle plusieurs symptômes du syndrome de l'X fragile sont expliqués par un déséquilibre de l'activation des mGluR, ils ne constituent que des données phénotypiques. Les bases moléculaires du lien entre FMRP et les récepteurs au glutamate restent à être déterminées. Chez la drosophile, l'utilisation de MPEP a également permis de rétablir partiellement un phénotype sauvage (McBride et al., 2005) indiquant que les bases moléculaires de la plasticité synaptique impliquant FMRP/dFXR et l'activation des mGluR sont conservées entre les espèces. Par ailleurs, bien que les antagonistes des mGluR constituent des molécules pharmacologiques de choix pour le traitement du syndrome de l'X fragile, aucun d'entre eux n'est, à l'heure actuelle, disponible. Un criblage moléculaire, sur les drosophiles dFmr1^{-/-}, a permis récemment l'identification de 9 petites molécules qui favorisent la restauration d'un phénotype sauvage (Chang et al., 2008). Parmi ces composés, trois régulent le mécanisme des récepteurs GABA et deux celui des récepteurs cholinergiques muscariniques suggérant l'implication de ces récepteurs dans le syndrome de l'X fragile. Ces résultats mettent en avant le potentiel de l'utilisation des modèles de pathologie humaine, tels que les drosophiles, dans les études de criblage moléculaire.

L'étude de la plasticité synaptique des modèles animaux du syndrome de l'X fragile suggère de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients X fragile, mais aussi pour un large champ de patients autistes ou atteints par un retard mental d'origine différente.

IV. LA TRADUCTION EUCARYOTIQUE : MÉCANISMES GÉNÉRAUX ET RÉGULATION

De nombreuses évidences indiquent que la régulation post-transcriptionnelle semble essentielle à la régulation de l'expression génique, et, plus particulièrement, que la régulation traductionnelle permet aux cellules la plasticité nécessaire à une réponse rapide et efficace aux changements de l'environnement extra-cellulaire. La traduction étant la dernière étape de l'expression de l'information génétique, sa régulation permet une réponse rapide vis à vis d'un changement des conditions physiologiques ou de la communication inter-cellulaire, comme, par exemple, lors de la transmission des signaux synaptiques entre les neurones ou lors d'un stress cellulaire.

1. La traduction

La traduction est divisée en trois phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la traduction est l'étape la plus régulée. En effet, il apparaît plus simple de contrôler le début d'un processus biologique que de l'interrompre ou de produire des protéines aberrantes qu'il faudra ensuite éliminer, avec consommation d'énergie, pour éviter tout risque à la cellule (Mathews, 2002). Seule l'initiation sera développée dans ce paragraphe (pour revue (Gebauer and Hentze, 2004; Klann and Dever, 2004)).

1.1) L'initiation de la traduction coiffe dépendante

L'initiation de la traduction est un mécanisme complexe en plusieurs étapes (figure 22). Avant le début de l'initiation, il y a assemblage de plusieurs complexes multiprotéiques (figure 23a). L'initiation de la traduction est déclenchée par l'hydrolyse du GTP, fixé sur le facteur eIF2, en GDP lorsque le codon d'initiation de la traduction AUG est reconnu. Le GDP fixé sur eIF2 est remplacé par un GTP grâce au facteur d'échange eIF2ß ce qui permet à eIF2 de reformer un complexe ternaire fonctionnel lors d'un nouveau tour d'initiation de la traduction (figure 23a) (Hinnebusch et al., 2004).

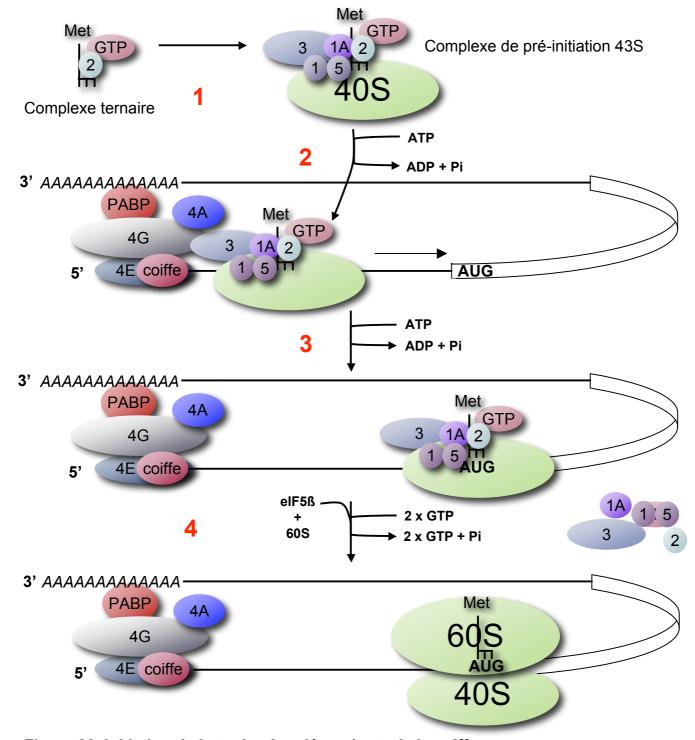


Figure 22. Initiation de la traduction dépendante de la coiffe

- 1- L'ARNt initiateur s'associe au GTP couplé à elF2 pour former le complexe ternaire. Ce complexe s'associe ensuite à la petite sous-unité ribosomale 40S, à elF3 et à d'autres facteurs d'initiation formant ainsi le complexe de pré-initiation 43S.
- 2- Ce complexe reconnaît alors l'ARNm par l'interaction de eIF3 avec la sous-unité eIF4G. En plus d'eIF4G, le complexe de la coiffe contient eIF4E, qui se fixe directement sur la coiffe et eIF4A, l'ARN hélicase jouant un rôle important lors du premier scan de l'ARNm. eIF4G interagit également avec la PABP, ce qui permet la circularisation de l'ARNm.
- 3- Le complexe 43S scan l'ARNm des extrémités 5' vers 3' jusqu'à identifier le codon d'initiation AUG. Ce scan est assisté par les facteurs eIF1 et eIF1A.
- 4- La fixation stable du complexe 43S sur le codon AUG forme le complexe 48S complété par l'arrivée de la grande sous-unité ribosomale 60S afin de constituer le complexe d'initiation 80S.

(d'après Gebauer et Hentze, 2004)

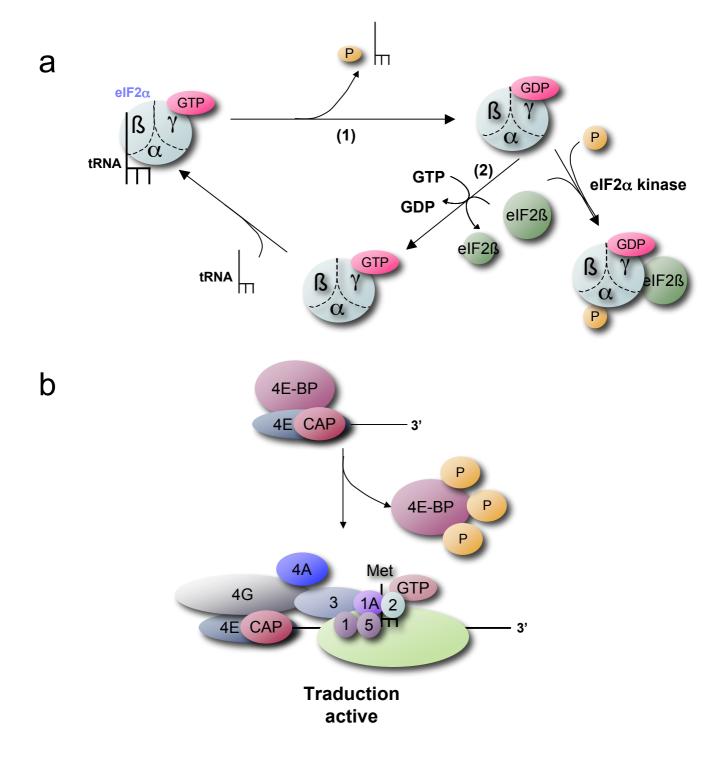


Figure 23. Le contrôle de la synthèse protéique

a. elF2 est constituée de trois sous-unités, α , β et γ , qui forment un complexe ternaire. Dans un complexe ternaire actif, la sous-unité γ de elF2 s'associe au GTP hydrolysé en GDP lors de l'initiation de la traduction (1). L'échange de GDP en GTP est catalysé par elF2 β (2). Cette étape est nécessaire pour la régénération de elF2. La phosphorylation de elF2 sur la sous-unité α bloque la dissociation elF2 β -elF2 et la réaction d'échange de GDP en GTP (3).

b. Le facteur 4E-BP se fixe sur elF4E et prévient de ce fait la fixation de elF4G sur elF4E, ce qui induit l'inhibition de la traduction. La phosphorylation de 4E-BP permet sa dissociation et laisse l'accès à elF4G qui recrute toute la machinerie de l'initiation de la traduction.

(d'après Gebauer et Hentze, 2004)

1.2) L'initiation de la traduction coiffe-indépendante

Environ 3 à 5% des ARNm cellulaires seraient traduits suivant un mécanisme indépendant de la coiffe (Johannes et al., 1999). Il a été montré que certains de ces ARNm contiennent un site particulier de recrutement des ribosomes : une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) en 5' du codon d'initiation (figure 24) (Hellen and Sarnow, 2001; Holcik and Sonenberg, 2005; Johannes and Sarnow, 1998). La régulation de la traduction des ARNm cellulaires par une IRES sont encore mal comprises. Des ARNm connus pour être traduits par ce mécanisme contiennent une longue région 5' UTR avec une séquence riche en GC et une structure secondaire importante pour le recrutement de la machinerie de traduction. Par ailleurs, l'absence d'une séquence consensus ou d'une structure secondaire, reconnues comme IRES, rend difficile leur prédiction par bioinformatique.

2. Régulation de la traduction par les facteurs protéiques

Après leur export nucléo-cytoplasmique, certains ARNm restent à l'état quiescent et ne sont traduits que suite à une relocalisation subcellulaire et/ou stimulation de leur traduction par des stimuli extérieurs. Parmi ces ARNm on peut citer à titre d'exemple, les ARNm maternels, les ARNm des terminaisons neuronales ou des ARNm dont la traduction est inhibée par des microARN. Divers mécanismes peuvent rendre compte de cette inhibition de la traduction, seuls quelques exemples seront traités ici.

2.1) Inhibition globale de la synthèse protéique : régulation par phosphorylation des facteurs d'initiation

Le contrôle global de la synthèse protéique est généralement accompli par le changement de l'état de phosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction ou des facteurs régulateurs interagissant avec eux.

La protéine eIF2 est constituée de trois sous-unités : α , β et γ . La phosphorylation de l'acide aminé sérine 51 de la sous-unité α bloque la dissociation de eIF2 et eIF2 β et donc la réaction d'échange du GDP par le GTP ce qui inhibe globalement la traduction (figure 24a) (Rowlands et al., 1988). Différentes kinases, activées par différentes conditions de stress, peuvent phosphoryler eIF2 α (de Haro et al., 1996; Dever, 2002). Par exemple, PKR (Protein Kinase activated by double-stranded RNA) stimulée par une infection virale, GCN2 (General

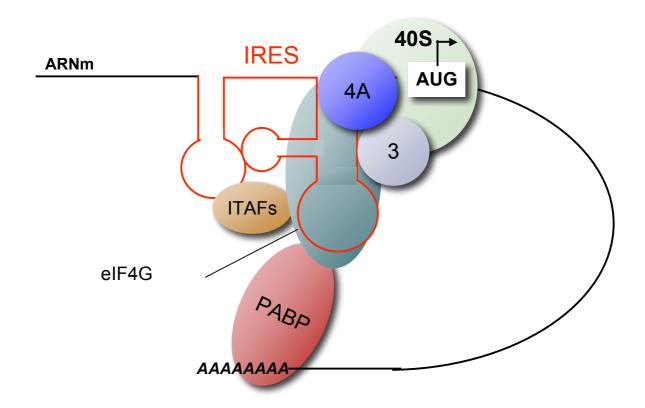


Figure 24. Initiation de la traduction dépendante d'une structure IRES

L'association des facteurs ITAFs et elF4G stimule la traduction *via* l'IRES. Seuls les elFs pertinents pour ce processus sont indiqués.

PABP = PolyA Binding Protein; IRES = Internal Ribosome Entry Site; ITAF = IRES Trans-Acting Factors; EIF4G = eukaryotic Initiation Factor 4G (d'après Holcik et Sonenberg, 2005) Control Non-Derepressible-2) activée en cas de déplétion en acide aminé. Dans les neurones, les phénomènes de plasticité synaptique et de mémorisation impliquent les mécanismes de régulation de la traduction. Il a été montré que la phosphorylation d'eIF2 α inhibe la traduction générale, mais stimule la synthèse d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4), un répresseur de la protéine CREB impliquée dans les phénomènes de LTP et de mémorisation (Costa-Mattioli et al., 2007). Le traitement de neurones en culture par le BDNF, qui induit la plasticité synaptique, diminue le taux d'eIF2 α phosphorylé et favorise la synthèse protéique (Takei et al., 2001). Par ailleurs, les souris mutantes eIF2 $\alpha^{+/S51A}$, dont le taux de phosphorylation d'eIF2 α est diminué, manifestent une induction de la LTP plus rapide et une mémorisation accrue (Costa-Mattioli et al., 2007). En revanche, le blocage de la déphosphorylation d'eIF2 α affecte ces phénomènes. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la régulation d'eIF2 α en particulier et de la régulation traductionnelle en général dans les phénomènes de plasticité synaptique et de mémorisation.

L'intégrité du complexe eIF4F, formé par l'association entre les facteurs eIF4E et eIF4G, (Gingras et al., 1999) peut également intervenir dans la régulation de la synthèse protéique (figure 24b). eIF4E interagit avec eIF4G afin de former le complexe eIF4F, nécessaire pour le recrutement dépendant de la coiffe du complexe 43S. La phosphorylation d'eIF4E favorise sa dissociation de la coiffe ce qui permet au ribosome de commencer le scanning de l'ARNm. Dans les neurones, la phosphorylation d'eIF4E est stimulée par ERK et serait induite par traitement avec le BDNF et le NMDA suggérant son implication dans la LTP, la plasticité synaptique et la mémorisation (Banko et al., 2004; Kelleher et al., 2004). L'association entre eIF4E et eIF4G nécessite un domaine particulier d'eIF4G présent dans une famille de protéines : les protéines 4E-BP (eIF4E-Binding Protein). Ces protéines hypophosphorylées interagissent avec eIF4E empêchant l'interaction entre eIF4E-eIF4G ce qui induit l'inhibition du recrutement du complexe 43S sur l'ARNm et donc de la traduction (Gingras et al., 1999; Pause et al., 1994). La phosphorylation des 4E-BP libère eIF4E, qui forme le complexe eIF4F avec eIF4G amorçant ainsi l'initiation de la traduction. Dans les neurones, la phosphorylation d'4E-BP est régulée par les protéines ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) et mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) (Raught et al., 2000) dont il a été montré dans plusieurs études qu'elles sont impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique et de mémorisation (Kelly and Lynch, 2000; Opazo et al., 2003; Thomas and Huganir, 2004). Le traitement des neurones au BDNF induit l'augmentation de la phosphorylation de 4E-BP et la formation du complexe

eIF4F qui sont associées à la LTP (Kelleher et al., 2004). Par ailleur, les souris knock-out pour 4E-PB présentent des altérations du comportement.

La régulation de la fonction des facteurs tels qu'eIF2, eIF4E et 4E-BP, impliqués dans l'initiation de la traduction, par leur phosphorylation, semble déterminante dans les phénomènes moléculaires à l'origine de la LTP, de la plasticité synaptique et de la mémorisation.

2.2) Inhibition du recrutement du complexe 43S

a) Blocage stérique/dégradation

La régulation post-transcriptionnelle peut également avoir lieu par encombrement de l'ARN empêchant la formation des complexes d'initiation. Par exemple, dans l'homéostasie du fer, la régulation traductionnelle est réalisée à l'étape d'initiation et au niveau de la stabilité des ARNm impliqués dans ce processus (figure 25) (pour revue (Zecca et al., 2004)). Les protéines IRP 1 et 2 (Iron Regulatory Proteins), protéines qui fixent le fer, sont des régulateurs modulant la traduction de la ferritine et de la transferrine impliquées dans le stockage cellulaire du fer. Dans les cellules déficientes en fer, IRP1/2 ne sont pas liées à des atomes de fer et se fixent sur le motif ARN IRE (Iron Responsive Element). Ce motif, de type tige-boucle, est formé par la région 5' UTR de l'ARNm ferritine et la région 3' UTR de l'ARNm transferrine. Le mode d'action du fer et des IRP sur la régulation des ARNm ferritine et transferrine est différent selon que le motif IRE est localisé en 5' ou 3' de l'ARNm (figure 25). Les IRE en 5' sont impliquées dans la régulation de l'initiation de la traduction pour la ferritine (Gray and Hentze, 1994; Muckenthaler et al., 1998), et les IRE en 3' agissent sur la stabilisation de l'ARNm de la transferrine (Leipuviene and Theil, 2007). Selon, la position d'un motif formé par l'ARNm favorisant le recrutement de facteurs protéiques, leurs effets sur la traduction peuvent être différents voire atagonistes. Les motifs G-quartets ont également été identifiés dans les régions 5' et 3' UTR et, tout comme celui des motifs IRE, leur impact sur la régulation du métabolisme des ARN pourrait être différent selon leur localisation.

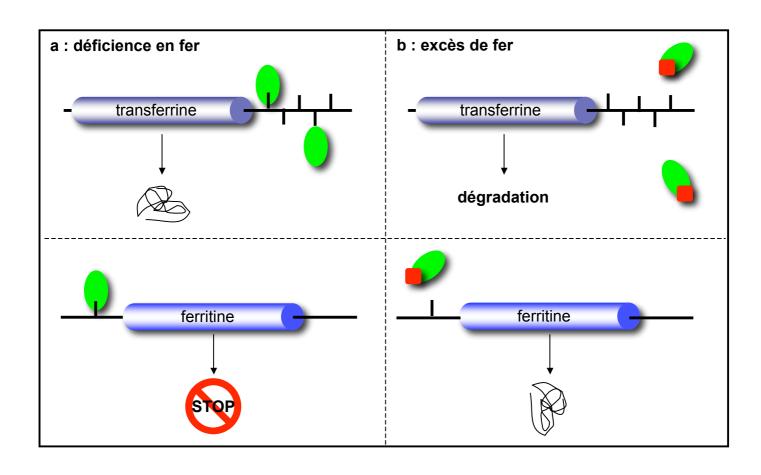






Figure 25. Schémas de régulation de la traduction des ARNm (par encombrement stérique/dégradation)

Exemple de la régulation de l'expression de la transferrine et de la ferritine par les protéines IRP et leur séquence ARN cible IRE.

La production des protéines transferrine et ferritine est régulée au niveau de leur ARNm par les protéines IRP. Les protéines IRP se fixent sur les motifs ARN IRE localisés dans les régions 5' et 3' UTR des ARNm ferritine et transferrine respectivement.

- a. Dans le cas d'une déficience en fer, les IRP se fixent sur les IRE de l'ARNm transferrine, le protégeant de la dégradation et favorisant la synthèse de transferrine, et de l'ARNm ferritine inhibant sa traduction.
- b. En abondance de fer, les IRP ne peuvent pas se fixer sur les éléments IRE induisant la dégradation de l'ARNm transferrine et l'expression de la ferritine.

IRE = Iron Resposive Element; IRP = Iron Responsive Protein (d'après Zecca *et al.*, 2004)

b) Inhibition de la protéine eIF4E

La régulation de la traduction peut se faire par recrutement de facteurs spécifiques sur l'ARNm grâce à des motifs spécifiques, mais aussi en séquestrant les facteurs d'initiation de la traduction.

Chez la drosophile, la traduction des ARNm *Nanos* et *Oskar*, impliqués dans la formation de l'axe antéro-postérieur durant le développement de la drosophile, est inhibée lorsqu'ils sont en transit vers leur site spécifique d'utilisation. La protéine Cup est recrutée sur la région 3' UTR des ARNm *Nanos* (Nelson et al., 2004) et *Oskar* (Nakamura et al., 2004; Wilhelm et al., 2003). Une fois recrutée sur les ARNm, Cup lie eIF4E et constitue un obstacle pour la reconnaissance d'eIF4E par eIF4G favorisant l'inhibition de la traduction.

Chez les métazoaires, la transcription de novo n'est établie qu'après plusieurs divisions cellulaires. L'ovocyte doit accumuler et stocker des ARNm maternels nécessaires aux premières étapes du développement. Dans l'ovocyte immature, plusieurs ARNm maternels sont réprimés au niveau traductionnel par un mécanisme de raccourcissement de la queue poly-A dont la taille initiale passe de 200-250 à 20-40 adénosines. Ce raccourcissement est modulé par CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) qui reconnaît l'élément CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element) riche en uridines dans la région 3' UTR de l'ARNm. Pour réprimer la traduction, CPEB interagit avec Maskin, protéine qui possède un domaine de liaison à eIF4E semblable à celui d'eIF4G (Stebbins-Boaz et al., 1999). Le complexe Maskin-CPEB est concidéré comme un facteur 4E-BP spécifique capable de séquestrer eIF4E empêchant ainsi son interaction avec eIF4G (Stebbins-Boaz et al., 1999). Dans un contexte où la queue poly-A est raccourcie, l'ARNm ne recrute ni la PABP ni eIF4G et l'interaction Maskin-eIF4E inhibe la traduction. Lors de l'entrée de l'ovocyte en méiose, CPEB est phosphorylée augmentant son affinité pour le facteur CPSF (Cytoplasmic Polyadenylation Specific Factor) qui, recruté sur la région 3' UTR de l'ARNm va stimuler l'élongation de la queue poly-A par la PAP (Poly-A Polymerase) cytoplasmique. La fixation de la PABP sur la queue poly-A permet alors le recrutement d'eIF4G pour l'initiation de la traduction (pour revue (Richter and Sonenberg, 2005)). Dans les prolongements dendritiques, le même phénomène aurait lieu (figure 26). Dans ce cas, la polyadénylation et la traduction des ARNm contenant un CPE, cible de CPEB, résulte de la stimulation des neurones par le NMDA (Huang et al., 2002). Il a été montré que l'ARNm de la protéine CaMKII, rapidement synthétisée après stimulation neuronale et impliquée dans les phénomènes de LTP et de mémorisation, est une cible de CPEB. De plus, CPEB est régulée par sa phosphorylation par

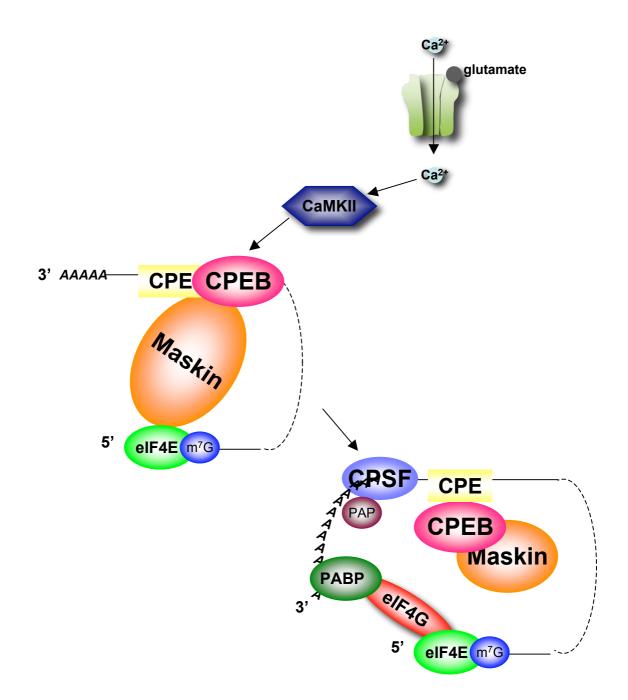


Figure 26. Mécanisme de régulation de l'interaction du complexe 43S avec la coiffe : exemple des neurones

La protéine Maskin, une protéine 4E-BP, interagit avec eIF4E empêchant son interaction avec eIF4G. Maskin est recrutée sur l'ARNm *via* CPEB qui elle-même reconnaît la séquence CPE localisée dans la région 3' UTR de l'ARN.

CPEB = cytoplasmic polyadenylation element-binding protein; CPSF = cytoplasmic polyadenylation specifity factor; CPE = cytoplasmic polyadenylation element; eIF4E/4G = eucaryotic initiation factor 4E/4G; 4E-BP = eIF4E Binding Protein; PABP = poly(A) binding protein; PAP = poly(A) polymerase; CaMKII = calcium-calmodulin dependant protein kinase II

(d'après Klann et Dever, 2004)

CaMKII suggérant que l'activation de CaMKII par stimulation des neurones pourrait activer et favoriser le maintien de la traduction des ARNm contenant un CPE, dont l'ARNm *CaMKII*.

Finalement, la répression de la traduction est également importante durant le transport des ARNm dans les prolongements neuronaux afin de prévenir leur traduction non localisée. L'activité neuronale semble directement liée à la synthèse protéique localisée requise pour la plasticité synaptique et la consolidation des phénomènes de mémorisation et d'apprentissage (§ III-1-1.2-b). Les ARNm réprimés s'accumulent dans des granules d'ARN (§ IV-4-5.2) de transport qui contiennent plusieurs protéines de liaison à l'ARN, inhibitrices de la traduction dont FMRP (tableau 4). Bien que de nombreuses études suggèrent l'implication de FMRP dans le transport et/ou la régulation de la traduction locale synaptique d'ARNm cibles particuliers, les mécanismes impliquant FMRP restent incompris. Il a été observé que CPEB et Maskin co-localisent dans les granules de transport (Huang et al., 2003) et ont été détectés dans les synapses (Huang et al., 2002). Par ailleurs, des études menées sur la souris knock-out pour CPEB ont révélé une altération de la plasticité synaptique (Alarcon et al., 2004). Ces résultats laissent supposer que ces deux molécules pourraient influencer la plasticité synaptique en contrôlant la traduction dépendante de CPE et en agissant conjointement avec FMRP (par exemple recrutée sur les ARNm par son interaction avec les G-quartets).

3. Régulation de la traduction par les ARN non codants

3.1) Les ARN non codant neuronaux BC1/BC200

Comme évoqué dans le paragraphe II-5-5.1-b (figures 16-17) les ARN non codants BC1 et BC200 seraient impliqués dans la régulation de la traduction neuronale selon deux mécanismes proposés. L'un, vivement controversé, postule que les ARN BC1/BC200 régulent la traduction *via* le recrutement de FMRP sur ses ARNm cibles (Zalfa et al., 2005; Zalfa et al., 2003). Le second modèle postule que la séquence riche en adénine entre les deux tige-boucle de BC1/BC200 séquestre la PABP, et probablement d'autres facteurs de la traduction, et par conséquent inhibe la traduction (Brosius and Tiedge, 2001).

3.2) Le mécanisme d'ARN interférence

Durant cette dernière décennie, les récents progrès réalisés dans la compréhension du rôle des petits ARN non-codants ont permis la découverte de nouveaux mécanismes de régulation de l'expression génique. Ces connaissances ont permis d'éclaircir le réseau moléculaire complexe contrôlant les phénomènes spatio-temporels précis et cruciaux dans de nombreux processus cellulaires. Une classe de petits ARN non codants régulateurs est largement étudiée depuis plusieurs années : les petits ARN interférents et les micro-ARN, d'environ 22 nucléotides, régulateurs négatifs de l'expression génique inhibant la synthèse protéique ou induisant la dégradation de l'ARNm (figure 27).

a) Origine et biosynthèse des siARN et des miARN

L'origine génétique et leurs étapes de maturation semblent être les seules caractéristiques qui différencient les siARN des miARN (figure 27).

siARN

Les siARN sont les produits du clivage de longs ARN double-brin d'origine exogène (ARN double-brin viraux ou transfection cellulaire de siARN synthétiques) ou endogène (transcription bidirectionelle ou transposon). Ces longs ARN double-brin sont clivés en siARN matures dans le cytoplasme par la protéine Dicer, membre de la famille des enzymes RNase III.

miARN

La genèse de miARN est initiée par la production de transcrits endogènes plus ou moins longs contenant des répétitions quasi-complémentaires inversées. Les transcrits sont issus la plupart du temps, soit de gènes indépendants ne codant que pour des miARN, soit de fragments originaires de séquences introniques. Ces longs transcrits se replient sur eux-mêmes pour former une structure ARN double-brin en "épingle à cheveux" appelée le miARN primaire ou pri-miARN. Cette molécule est clivée dans le noyau par la protéine Drosha, qui, tout comme Dicer, est un membre de la famille des RNase III. Elle donne une structure en épingle irrégulière et plus courte formée d'environ 70 nucléotides appelée le miARN précurseur ou pré-miARN. L'export du pré-miARN dans le cytoplasme est médié par l'exportine 5. Une fois localisé dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par Dicer.

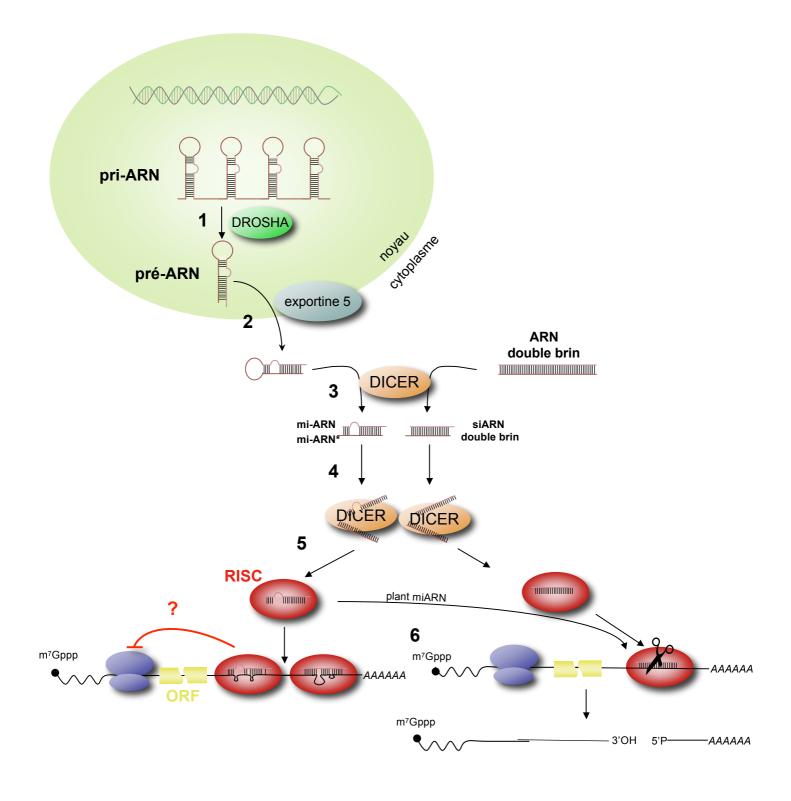


Figure 27. Biosynthèse et régulation post-transcriptionnelle des micro-ARN (miARN) et des petits ARN interférents (siARN)

- 1. Dans le noyau, la protéine Drosha clive les pri-ARN en pré-ARN (ARN en tige-boucle de 70 nucléotides).
- 2. Les pré-ARN sont exportés dans le noyau par l'exportine 5
- 3. Dans le cytoplasme, la protéine Dicer mature les pré-ARN et longs ARN double-brin (viraux, transposons, ...) en miARN et siARN respectivement.
- 4-5. Le brin du duplex complémentaire à l'ARNm (celui qui a, au sein du duplex, l'extrémité 5' la moins stable) est incorporé dans le complexe RISC.
- 6. Via leur appariement avec les ARNm, les miARN ou siARN favorisent leur recrutement au sein du complexe RISC afin d'inhiber leur traduction ou d'induire leur dégradation.

Les siARN et miARN produits naturellement possèdent des extrémités 5' phosphorylées et 3' hydroxylées ainsi que deux nucléotides 3' sortants (Elbashir et al., 2001; Lau et al., 2001). Une étude dans les cellules HeLa a montré que les duplex synthétisés *in vitro*, présentant une extrémité 5' hydroxylée, sont, quant à eux, rapidement phosphorylés *in cellulo* (Weitzer and Martinez, 2007).

b) Les composés et la formation du complexe RISC

Les siARN et miARN fonctionnent au sein du complexe ribonucléoprotéique RISC (RNA Induced Silencing Complex) identifié dans les cellules de *C. elegans*, de drosophile et humaines (pour revue : (Sontheimer, 2005)).

Les protéines Argonaute

Le complexe RISC est constitué de plusieurs protéines dont les protéines Argonaute qui jouent un rôle central dans le mécanisme d'ARN interférence. La découverte de la famille des protéines Argonaute, très conservée dans les différentes espèces, et la compréhension de leurs activités sont étroitement liées à l'étude des mécanismes d'ARN interférence dans lesquels leur fonction est essentielle.

La combinaison d'analyses cristallographique et biochimique, réalisées ces dernières années, a permis de caractériser les fonctions des différents domaines, PAZ, PIWI, Mid et N-terminal, présents dans les protéines Argonautes. Le domaine PAZ possède un sous-domaine "OB-like" (Oligonucleotides-Binding) qui lui permet de lier les ARN simple-brin des si/miARN en reconnaissant leurs extrémités 3' sortantes (Lingel et al., 2003; Song et al., 2003; Yan et al., 2003). L'analyse structurale des domaines PIWI a montré que leur repliement est identique à celui des endonucléases RNase H qui catalysent le clivage ADN-dépendant des ARN. Ce domaine est, en effet, impliqué dans le clivage des ARNm ciblés par RISC (Ma et al., 2005; Parker et al., 2004; Song et al., 2004; Yuan et al., 2005) en présence de cation divalent (Schwarz et al., 2004). Les produits de clivage possèdent une extrémité 5' monophosphorylée et une extrémité 3' hydroxylée (Martinez and Tuschl, 2004). Cependant, contrairement aux miARN de plante, la plupart des miARN des cellules animales n'induisent pas l'activité endonucléase.

Les autres protéines du complexe RISC

Le complexe RISC fonctionnel minimal de 100 à 160 kDa contiendrait la/les protéines Ago associées au brin du si/miARN (Rand et al., 2004). Les protéines co-purifiées avec le complexe RISC sont Dcr2 et R2D2 suggérant que ces facteurs, impliqués dans le chargement du brin d'ARN sur le complexe RISC, ont une/d'autres fonctions, toujours inconnues, dans le mécanisme d'ARN interférence.

Chez la drosophile, d'autres protéines ont été co-purifiées avec le complexe RISC. Tudor-SN (Tudor Staphylococcal Nuclease) (Caudy et al., 2003), interagit avec et induit le clivage d'ARN double-brin ayant subit de multiples phénomènes d'édition (Scadden, 2005). Cette protéine établirait un lien subtil entre les mécanismes d'ARN interférence et d'édition de l'ARN. Suite à une infection virale, les longs ARN double-brin viraux présents dans le cytoplasme seraient la cible de différents phénomènes. Soit ils sont clivés en siARN par Dicer et utilisés par le complexe RISC dans les mécanismes d'ARN interférence impliqués dans le système de défense cellulaire antiviral. Soit ils subissent un processus d'édition, ce qui les rend inutilisables pour Dicer, et sont détruits par Tudor-SN. Or, certains précurseurs de si/miARN subissent également un phénomène d'édition (Knight and Bass, 2002). Ce pourrait être des précurseurs impropres au bon fonctionnement de RISC et l'édition induirait leur dégradation par Tudor-SN afin de les exclure définitivement du mécanisme d'ARN interférence et d'éviter tout risque de régulation post-transcriptionnelle aberrante. VIG (Vasa Intronic Gene) et dFXR, l'homologue de FMRP chez la drosophile (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002) ont également été co-purifiées avec le complexe RISC. Cependant, le rôle de ces protéines, en particulier celui de FMRP, dans les mécanismes d'ARN interférence reste à ce jour méconnu.

c) Mécanismes d'action des siARN et des miARN

La conservation de la séquence des miARN au sein des espèces, l'abondance de certains d'entre eux dans les cellules, leur implication dans des processus aussi divers que le développement, la croissance, la différenciation cellulaire ou l'apoptose sont autant de critères déterminants permettant de suspecter le rôle essentiel de ces ARN dans la cellule. La compréhension des mécanismes d'action de ces petits ARN a été facilitée par leur analogie. En raison de caractéristiques structurales communes et de fonctions interchangeables (Doench et al., 2003; Llave et al., 2002; Zeng et al., 2003), il est maintenant admis que les si-miARN sont pris en charge par le même complexe ribonucléoprotéique, RISC.

Les mécanismes d'action : inhibition de la traduction ou dégradation de l'ARNm (figure 27)

Un ARNm peut être régulé par plusieurs si/miARN de même qu'un si/miARN peut ciblé plusieurs ARNm. Lorsqu'un si-miARN est incorporé dans le complexe RISC, le brin choisi lui sert de guide vers sa cible ARNm. En fonction de la qualité de l'appariement si/miARN:ARNm, parfait ou non, la machinerie RISC régule l'expression génique soit par inhibition de la traduction, soit par dégradation de l'ARNm. De manière générale, il est admis que la complémentarité parfaite entre l'ARNm et le si/miARN induit le clivage puis la dégradation de l'ARNm alors que si le duplex si/miARN:ARNm contient un mésappariement, il y a inhibition de la traduction sans que la stabilité de l'ARNm ne soit affectée. Le dogme selon lequel les siARN induisent la dégradation de l'ARNm alors que les miARN induisent l'inhibition de la traduction a été bousculé par la démonstration de leur fonction interchangeable (Doench et al., 2003; Zeng et al., 2003) et par certaines exceptions identifiées. Par exemple, chez les vertébrés, miR-196 dirige le clivage de l'ARNm *Hoxb* 8 malgré l'appariement imparfait à sa cible (Yekta et al., 2004). Chez les plantes, la plupart des miARN connus induisent le clivage de leur cible (Baulcombe, 2004).

L'induction du clivage de l'ARNm ne nécessite qu'un seul site d'hybridation dont l'appariement si/miARN:ARNm est parfait. Le clivage est réalisé entre les nucléotides 10 et 11 de l'appariement si/miARN:ARNm en comptant à partir de l'extrémité 5' du siARN (Elbashir et al., 2001; Llave et al., 2002) et résulte de l'activité endoribonucléolytique du domaine RNase H de Ago2 (Meister et al., 2004; Miyoshi et al., 2005). De plus, les miARN de mammifères peuvent également induire la dégradation de l'ARNm cible malgré la présence de mésappariements dans le duplex miARN:ARNm (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006a; Behm-Ansmant et al., 2006b; Giraldez et al., 2006; Jing et al., 2005; Lim et al., 2005; Rehwinkel et al., 2005).

L'inhibition de la traduction de l'ARNm nécessite plusieurs sites d'hybridation présentant des mésappariements reconnus par un ou plusieurs miARN. L'effet répressif des miARN s'exercerait essentiellement grâce à Ago2 puisqu'il a été mimé dans les cellules HeLa par la seule fixation, indépendante des miARN, d'Ago 2 sur un ARNm (Pillai et al., 2004). Les mécanismes contrôlant l'inhibition de la traduction sont encore mal compris. Cependant, plusieurs évidences indiquent que les miARN peuvent réprimer la traduction à l'étape d'initiation ou post-initiation.

Ainsi, le déplacement des polyribosomes vers les fractions légères d'un gradient de sucrose d'un ARNm endogène ou rapporteur, réprimé par un miARN endogène ou exogène

ou par le ciblage, indépendant des miARN, d'Ago2 sur l'ARNm, indique l'effet du miARN à l'étape d'initiation (Bhattacharyya et al., 2006; Pillai et al., 2005). Par ailleurs, l'activité des miARN semble être dépendante de la coiffe. Un ARNm ne possédant pas de coiffe à son extrémité 5' n'est pas réprimé dans un extrait de réticulocytes de lapin qui peut toutefois reproduire l'activité RISC (Wang et al., 2006). Un ARNm rapporteur, transfecté dans les cellules HeLa et dont la traduction ne dépend pas de la coiffe mais d'une IRES, est insensible à l'effet des miARN (Humphreys et al., 2005; Petersen et al., 2006). L'ensemble de ces données supportent un modèle selon lequel l'inhibition de la traduction par l'activité RISC se ferait à l'étape d'initiation.

Toutefois, des évidences supportant la répression au niveau post-initiation ont également été obtenues à la fois dans C. elegans et des cellules de mammifère en culture grâce aux mêmes techniques de purification des ARNm associés aux polysomes par gradient de sucrose. Un ARNm rapporteur soumis à l'activité du miARN let-7 reste associé aux polyribosomes en cours de traduction alors qu'il n'y a pas d'accumulation de la protéine rapporteur (Nottrott et al., 2006). Une autre étude réalisée dans des cellules humaines a montré que la plupart des miARN est associée aux polysomes en cours de traduction (Maroney et al., 2006). Dans l'ensemble de ces études, le profil de localisation des ARNm dans les fractions polyribosomales est indépendant de la répression par le miARN suggérant l'intégrité de l'étape d'initiation. Il existe un certain nombre de résultats contradictoires sur le mode de répression traductionnelle, initiation/élongation. La localisation polyribosomale de l'ARNm lin-14, régulé par le miARN lin-4, ne change pas en fonction des conditions de répression (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules de mammifère cotransfectées avec un gène rapporteur et des siARN synthétiques complémentaires de cibles situées sur l'ARNm (Petersen et al., 2006). L'utilisation de plasmides rapporteurs bicistroniques contenant un cistron dont la traduction est dépendante soit de la coiffe, soit d'une séquence IRES a permis de montrer que les deux cistrons sont réprimés par le miARN synthétique ce qui est cohérent avec un effet du miARN en post-initiation. Ces résultats pourraient être expliqués par un modèle selon lequel les ribosomes engagés dans la traduction d'ARNm associés à des miARN termineraient leur traduction prématurément. Une alternative serait le recrutement par les miRNP d'enzymes protéolytiques qui dégraderaient très rapidement la chaîne polypeptidique naissante émergeant des ribosomes en cours de traduction. Ceci empêcherait l'accumulation de protéines aberrantes dans la cellule. Cependant, l'incapacité à visualiser, par exemple par incorporation de ³⁵S-méthionine, une chaîne polypeptidique naissante dont l'ARNm est sous

contrôle de miARN ne supporte pas cette hypothèse (Petersen et al., 2006). Par ailleurs, le ciblage de la chaîne polypeptidique vers le réticulum endoplasmique devrait protéger la protéine naissante de la dégradation ce qui rendrait complètement inutile la répression de l'ARNm par le miARN. Au contraire, le ciblage de la protéine vers le réticulum endoplasmique n'empêche pas la répression par un miARN endogène ou par le ciblage de la protéine Ago2 sur la région 3' non traduite de l'ARNm (Pillai et al., 2005).

Réversibilité de la répression traductionnelle médiée par les miARN

Il a été montré que les ARNm soumis à l'action d'un si-miARN s'accumulent dans des foci cytoplasmiques appelés Processing-Bodies, P-Bodies ou PB. Bien que les P-Bodies contiennent la machinerie de dégradation des ARNm, les ARNm transportés vers ces structures ne sont pas systématiquement dégradés. En effet, en réponse à un stimuli environnemental (par exemple réactivation de la traduction suivant une carence), les ARNm sont libérés des P-Bodies et soumis à la traduction (Bhattacharyya et al., 2006; Brengues et al., 2005; Pillai et al., 2007).

Un autre exemple est la protéine de transport d'acides aminés cationiques, CAT-1 (Cationic Amino-acids Transporter-1) (figure 28a). La traduction de l'ARNm *CAT-1* est réprimée par miR-122, microARN spécifique des cellules hépatiques, et *CAT-1* s'accumule dans les P-Bodies. Lorsque les cellules sont privées d'acides aminés, l'ARNm *CAT-1* est libéré des P-Bodies et recruté au niveau des polysomes ce qui induit la synthèse de CAT-1 (Bhattacharyya et al., 2006). La dérépression de *CAT-1* implique la protéine HuR, une protéine de liaison aux éléments riches en séquences AU présents dans la région 3' UTR de l'ARNm *CAT-1*. En réponse à un stress, HuR est transloquée du noyau vers le cytoplasme, où elle module la traduction et/ou la stabilité de différents ARNm (Brennan and Steitz, 2001; Lal et al., 2005). Certains des effets de HuR sur la traduction et la stabilité des ARNm pourraient résulter de l'interférence avec les fonctions des miARN. L'ensemble de ces données suggère l'utilisation par les cellules des P-Bodies comme des sites de stockage temporaire des ARNm réprimés.

C'est, par exemple, le cas la protéine kinase Limk1 impliquée dans le développement des épines dendritiques des cellules neuronales (figure 28b). miR-134, présent au niveau des épines dendritiques, réprime la traduction de l'ARNm *Limk1* (Schratt et al., 2006). Le traitement de cellules neuronales de rat par le facteur BDNF (Brain-Derived Neurotropic Factor) stimule la synthèse de la protéine Limk1 dont l'ARNm est libéré de la répression de

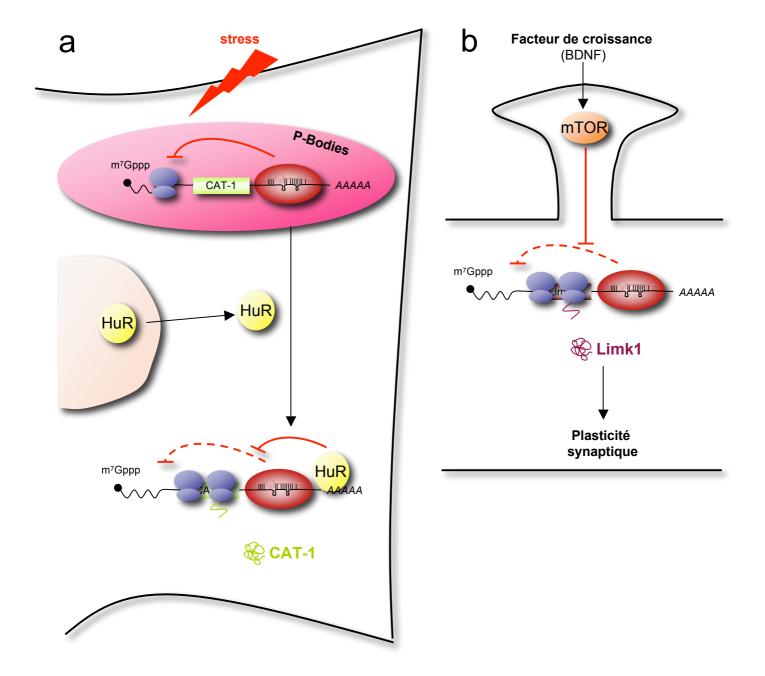


Figure 28. Exemples de réversion de la répression médiée par les miARN en réponse à différents stimuli

- a. Libération de l'ARNm *CAT1* de la répression par miR-122 dans des hépatocytes Huh7 soumis à différents stress. En réponse au stress, la protéine HuR est transloquée du noyau vers le cytoplasme, se lie à la région 3' UTR de l'ARNm *CAT1* et favorise sa libération des P-Bodies afin qu'il puisse être soumis à la traduction (d'après Bhattacharyya et al., 2006).
- b. Activation de la traduction de l'ARNm *LimK1*, réprimé par miR-134, dans les cultures de neurones hippocampaux de rat. Le traitement au BDNF induit la libération partielle de *LimK1* de la répression lors d'un processus impliquant probablement la kinase mTOR.
- CAT1 = Cationic Amino-acid Transporter 1; HuR = Hu antigen R; BDNF = Brain-Derived Neurotrophic Factor; Limk1 = LIM domain Kinase 1; mTor = Mammalian Target Of Rapamycin (d'après Schratt *et al.*, 2006).

miR-134 (Schratt et al., 2006). Toutefois, le mécanisme d'action du BDNF sur la dérépression des miARN reste encore incompris.

RISC, plasticité synaptique et mémoire

Comme évoqué précédemment, la plasticité synaptique, impliquée dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation, nécessite la synthèse locale de protéines importantes pour le fonctionnement des synapses. Chez la drosophile, l'association de la mémorisation à long terme et de la traduction synaptique grâce à un conditionnement combinant des stimuli olfactifs à des chocs électriques répulsifs a récemment été montrée (Ashraf et al., 2006). Dans les projections neuronales, le suivi de la localisation et de la traduction de l'ARNm CaMKII, kinase impliquée dans les phénomènes de mémorisation, par immunohistochimie et microscopie confocale, a permis l'analyse de la synthèse protéique locale. Un conditionnement comportemental, à l'origine de la mémorisation à long terme, résulterait du transport de l'ARNm CaMKII dans les dendrites et induirait la synthèse protéique locale jusqu'à 24 heures. En essayant de comprendre quel mécanisme pouvait contrôler la synthèse protéique post-synaptique, les auteurs ont identifié, dans l'extrémité 3' non traduite de l'ARNm CaMKII, une séquence potentiellement complémentaire de miARN. La réduction de l'activité RISC induit l'augmentation du transport de l'ARNm et de la synthèse protéique de CaMKII, et, inversement, la surexpression des composants du RISC induit la diminution de CaMKII. En partant de ce constat, les auteurs ont proposé que le conditionnement comportemental induirait la dégradation des composés du RISC par activation du protéasome au lieu où la synthèse protéique est activée.

4. Les structures cytoplasmiques à ARNm: les granules à ARNm

La composition, non exhaustive, de différents types de granules, dans lesquels FMRP a été retrouvée, est donnée dans le tableau 4.

Si la majeure partie des ARNm matures est intégrée dans la machinerie de traduction, certains ARNm, dont la traduction est inhibée, sont empaquetés dans des granules sous forme de mRNP. Ces structures ne possèdent pas de membranes, mais sont mises en évidence grâce aux protéines et aux ARN qui les composent. Bien que différentes classes de granules à ARN aient été décrites, elles présentent des composés protéiques communs et les mécanismes qui

classe de protéine	protéines	granules neuronales	processing bodies	granules de stress	granules germinales
ribosome	40S	Krichevsky and Kosik, 2001	Unpublished data	Kedersha et al., 2002	ND
	60S	Krichevsky and Kosik, 2001	Unpublished data	Kedersha et al., 2002	ND
traduction	elF2	Krichevsky and Kosik, 2001	Unpublished data	Kedersha et al., 2002	ND
	eIF3	ND	Kedersha et al., 2005	Kedersha et al., 2002	ND
	eIF4E	Smart <i>et al.</i> , 2003	Kedersha et al., 2005	Kedersha et al., 2002	Amiri et al., 2001
	4E-T	ND	Ferraiuolo et al., 2005	ND	ND
	PABP	Krichevsky and Kosik, 2001	Kedersha et al., 2005	Kedersha et al., 1999	ND
	RCK/CGH-1	ND	Cougot <i>et al.</i> , 2004	Kilczynska et al., 2005	Navarro and Blackwell, 2005
	TIA-1/R	ND	Kedersha et al., 2005	Kedersha et al., 2002	ND
stabilité des ARN	TTP	ND	Stoeklin et al., 2004	Stoecklin et al., 2004	ND
	HuR/D	Atlas <i>et al.</i> , 2004	Unpublished data	Gallouzi <i>et al.</i> , 2000	ND
RBP (RNA binding protein)	Staufen	Thomas <i>et al</i> ., 2005	Unpublished data	Thomas <i>et al.</i> , 2005	ND
	SMN	ND	ND	Hua and Zhou, 2004	ND
	G3BP	Atlas <i>et al.</i> , 2004	Kedersha et al., 2005	Tourrière et al., 2003	ND
	FMRP	De Diego Otero et al., 2002	Antar et al., 2005	Mazroui et al., 2002	ND
	MLN51	Macchi et al., 2003	ND	Baguet <i>et al.</i> , 2007	Van Eeden et al., 2001
protéines Sm/Lsm		ND	Ingelfinger <i>et al.</i> , 2002 Van Dijk <i>et al.</i> , 2002	Unpublished data	Audhya et al., 2005 Boag et al., 2005
décapping	DCP1/2	ND	Ingelfinger et al., 2002	Kedersha et al., 2002	Lall et al., 2005
exonucléases	Xrn1	ND	Bashkirov et al., 1997	Kedersha et al., 2002	ND
siRNA	GW182	ND	Eystathioy et al., 2003	Kedersha <i>et al.</i> , 2002	ND
	argonaute	ND	Liu et al., 2005	Unpublished data	ND

Tableau 4. Comparaison de la composition des granules cytoplasmiques à ARN Les cases vertes indiquent la présence de la protéine dans la catégorie de granule. Les cases rouges indiquent l'absence de la protéine dans la catégorie de granule. (d'après Anderson and Kedersha, 2006)

s'y déroulent révèlent des similarités. Cependant, à ce jour, leur rôle exact dans la régulation de la traduction, la dégradation ou le stockage des ARN n'est pas connu.

4.1) Les granules des cellules germinales

Historiquement, les premières observations et descriptions morphologiques des granules à ARN ont été faites par Metschnikoff en 1865. Cet auteur a décrit des granules foncés au niveau de l'un des pôles de larves de mouches *Miastor metraloas*. Des structures analogues ont été identifiées: les granules germinales chez *Xenopus laevis*, les granules polaires chez *D. melanogaster* et les granules P chez *C. elegans*. L'ensemble de ces granules est référencé sous l'appelation "Germ Cell Granules" (GCG). Ces granules sont composés de particules RNP qui contiennent des ARNm maternels requis pour la spécification des cellules germinales (Leatherman and Jongens, 2003; Schisa et al., 2001). Les GCG sont impliqués dans la régulation temporelle de la traduction des ARNm maternels afin de favoriser le développement des cellules germinales durant les stades embryonnaires précoces et établir les lignées germinales pour les générations futures. En plus des ARNm (Schisa et al., 2001), les GCG contiennent des protéines de liaison à l'ARN qui régulent leur traduction et leur dégradation (tableau 4). Les GCG contiennent également des protéines essentielles pour leur structure et le développement des cellules germinales (Johnstone and Lasko, 2001).

4.2) Les granules neuronaux à ARN

Dans les neurones, la localisation correcte des ARN contribue à la polarité cellulaire et à la plasticité synaptique. Les neurones ont développé un mécanisme pour la synthèse protéique locale dans la mesure ou les ARNm sont transportés du corps cellulaire vers les synapses pour y être traduits. Les ARNm, dont la traduction est inhibée, sont regroupés dans des granules à ARN pour leur transport vers les sites de traduction. Après leur transport au niveau des synapses, les ARNm sont libérés et traduits en réponse à des stimuli extérieurs.

Les granules neuronaux contiennent des ribosomes, des facteurs d'initiation de la traduction, des protéines de liaison à l'ARN telles que FMRP, G3BP ou Staufen. Ces granules à ARN ont un mouvement dynamique bidirectionnel dans les dendrites (Kohrmann et al., 1999). La mobilité dans les dendrites et la localisation synaptique de ces granules semblent être dépendantes des réseaux de microtubules (De Diego Otero et al., 2002) et sont régulées par l'activité synaptique (Rook et al., 2000; Zhang et al., 2001a). Le transport de ces granules

sur de longues distances utilise deux types de protéines jouant le rôle d'adaptateurs moléculaires, la dynéine et les kinésines (Kanai et al., 2004). Elles possèdent toutes deux une activité ATPasique et convertissent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique utilisée dans les transports antérograde et rétrograde le long des axones et des dendrites. Les granules neuronaux sont composés de nombreuses protéines de liaison à l'ARN qui peuvent être impliquées dans l'assemblage et/ou le transport des mRNP, la régulation traductionnelle ou la stabilité des ARNm. Leur composition inclut les protéines FMRP, FXR1P, FXR2P, Purα et Staufen parmi d'autres protéines (Kanai et al., 2004). Il a été montré dans les neurones Fmr1^{-/-} un défaut de formation des granules à ARN suggérant l'implication de FMRP dans leur formation et/ou leur fonction (Aschrafi et al., 2005). Récemment, l'identification de l'interaction de FMRP avec la kinésine neuro-spécifique KIF3C suggère que FMRP pourrait agir comme un adaptateur entre les granules neuronaux et les microtubules proposant une nouvelle fonction de FMRP dans leur transport (Davidovic et al., 2007). Différentes études réalisées sur la composition des granules neuronaux suggèrent l'existence de différents types de granules neuronaux régulés par des stimuli distincts en fonction du temps. En effet, la protéine ZBP1 (Zipcode Binding protien 1), retrouvée lors d'une étude sur le cerveau en développement (Elvira et al., 2006), n'a pas été identifiée parmi les protéines isolées à partir de cerveaux de souris adultes (Kanai et al., 2004).

Aujourd'hui, un enjeu important est de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la dynamique de composition, de transport et d'expression de ces granules.

4.3) Les granules de stress

De nombreuses années après la découverte des GCG, un autre type de granules à ARN a été observé dans des cellules de tomates soumises à un choc thermique (Nover et al., 1989). Ces granules, appelés granules de stress ou "Stress Granules" (SG), contiennent la majorité des ARNm cellulaires à l'exception des ARNm codant pour les protéines de choc thermique. Des SG de composition similaire ont été observés dans le cytoplasme de cellules de mammifère exposées à différents stress environnementaux tels que la température, des conditions oxydantes, l'irradiation aux UV ou l'hypoxie. En réponse au stress, les cellules eucaryotes reprogramment le métabolisme de l'ARN en remodelant les mRNP pour leur survie et la réparation des dommages engendrés par le stress. Durant ce processus, la traduction des protéines de maintien cellulaire est inhibée alors que celle des protéines

chaperonnes et enzymatiques impliquées dans la réponse cellulaire au stress est induite. Le recrutement des ARNm au niveau des SG semble être un événement spécifique contrôlé pour permettre une meilleure réorganisation des mRNP en vue de leur réintégration dans la traduction et/ou leur dégradation (Anderson and Kedersha, 2002).

Les SG contiennent différentes classes de protéines. Le complexe 48S de pré-initiation de la traduction, associé aux facteurs d'initiation eIF2, eIF3, eIF4E et eIF4G, constituent le cœur et représentent des marqueurs universels des SG (Kedersha et al., 2002; Kimball et al., 2003). Une deuxième classe de protéines, marqueurs fiables mais non universels, inclut des protéines impliquées dans la stabilité et l'inhibition des ARNm telles que, entre autre, TIA-1 (T-cell Internal Antigen-1) et TIAR (TIA-1 Related), FMRP, Argonaute, l'hélicase Rck/p54. Une troisième classe de protéines comporte des facteurs nécessaires à l'épissage, l'éditing ou la localisation des ARNm dont, G3BP (Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein), SMN, Staufen ou MLN51 (Metastatic LymphNode 51). Les SG comptent également des protéines qui ne semblent, à l'heure actuelle, n'avoir aucun rôle dans le métabolisme des ARNm comme DIS1 (Disrupted In Schizophrenia 1) ou TRAF2 (Tumor necrosis factor Receptor-Associted Factor 2) (Kim et al., 2005). Leur présence dans les SG doit être médiée grâce à leur interaction avec d'autres protéines des SG, par exemple, via eIF3 pour DIS1 (Ogawa et al., 2005) et eIF4G pour TRAF2 (Kim et al., 2005). Leur présence dans les SG suggère que les SG doivent intégrer des fonctions cellulaires différentes du métabolisme des ARNm.

Malgré leur apparente inertie morphologique, les SG sont des structures dynamiques. En effet, l'analyse de l'association de certaines protéines comme TIA-1, TIAR ou G3BP, révèle un échange rapide et une dynamique importante des entrées et sorties des différents facteurs (Kedersha et al., 2000; Kedersha et al., 2005). De plus, la stabilisation des polysomes par la cycloheximide inhibe l'assemblage des SG alors que leur déstabilisation par la puromycine stimule leur assemblage indiquant un équilibre dynamique entre ses structures (Kedersha et al., 2000).

Le processus de formation des SG peut être divisé en différentes étapes en fonction de leur composition ou de leur localisation.

1- La phosphorylation d'eIF2α (Kedersha et al., 1999) ou l'inactivation d'eIF4A (Dang et al., 2006; Mazroui et al., 2006) induit l'inhibition de l'initiation de la traduction générale ce qui aboutit à la formation de complexes 48S mRNP, substrats pour la formation des SG.

- 2- Lorsque l'initiation est inhibée, de nombreuses protéines provoquent la nucléation de leurs ARNm cibles en nombreuses petites SG grâce à leur propriété d'homodimérisation. Nombre de ces protéines induisent spontanément la formation des SG lorsqu'elles sont surexprimées, TIA1, TIAR, SMN, G3BP ou encore FMRP suggérant qu'elles conduisent indépendemment à la formation des SG. Notamment, TIA1 et TIAR, protéines nucléaires, présentent chacune trois domaines de liaison à l'ARN et un domaine "prion-like" riche en glutamine impliqué dans la formation des granules de stress (Hua and Zhou, 2004).
- 3- Ces petites SG fusionnent pour former des agrégats, moins nombreux et plus larges visibles au microscope, grâce à PABP, liée à tous les ARNm contenant une queue poly-A (Kedersha et al., 2000).
- 4- Les protéines ne possédant pas de propriétés de liaison à l'ARN sont alors recrutées dans les SG *via* des interactions protéine-protéine avec d'autres composés des SG.
- 5- Un modèle postule que les SG constituent un lieu de triage des ARNm dans lequel certains transcrits sont sélectionnés pour étre dégradés, d'autres, stockés (Anderson and Kedersha, 2006). Par ailleurs, certains transcrits peuvent être réorientés vers la traduction.

Il faut environ 24 h aux SG pour se dissocier après un stress lorsque les cellules retrouvent une physiologie normale.

Comme les SG semblent étre composés de plusieurs mRNP semi-indépendantes, il est difficile d'obtenir une vue globale de leur assemblage et de leur dissociation. En effet, les résultats d'expériences de visualisation en temps réel de ces phénomènes, qui nécessite la sélection d'une protéine marqueur, classiquement TIA-1, sont sans doute biaisés par l'absence d'observation des autres composés qui entrent dans la formation des SG.

4.4) Les Processing-Bodies

Il est maintenant établi que les Processing Bodies ou P-Bodies constituent un site de répression traductionnelle et de dégradation des ARNm. Ils sont, en effet, enrichis en facteurs impliqués dans ces mécanismes (pour revues : (Anderson and Kedersha, 2006; Coller and Parker, 2004)). Ces facteurs incluent des enzymes du NMD (Non-sense Mediated Decay) (Upf1-3, Smg5, Smg7 (Unterholzner and Izaurralde, 2004), des enzymes catalysant les réactions de déadénylation (le complexe Ccr4:Not1 (Andrei et al., 2005; Sheth and Parker, 2003)), de décapping (Dcp1 et Dcp2 ((Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002)), de la dégradation exonucléolytique 5'-3' (Xrn1 (Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003))

et de répression de la traduction (Dhhp1, Rck/p54, eIF4E-T et Pat1p). De nombreuses études ont récemment mis en évidence l'accumulation des protéines argonautes, des miARN et des ARNm ciblés par des miARN dans les P-Bodies (Liu et al., 2005b; Sen and Blau, 2005). Cependant, les P-Bodies ne contiennent pas de complexes ribosomales ni, mis à part eIF4E, de facteur d'initiation de la traduction. Il semble certain que les ARNm stockés dans les P-Bodies peuvent être, soit dégradés, soit réintégrés dans la traduction. Ils seraient donc impliqués dans le stockage des ARNm réprimés. Cependant, plutôt que d'être impliqués directement dans la dégradation ou la répression des ARNm, les P-Bodies augmenteraient l'efficacité de ces évènements. La concentration des mRNP réprimés dans les P-Bodies faciliterait les étapes de remodelage fortifiant la répression pour un stockage à long terme. D'autre part, ce remodelage accentuerait l'efficacité de la dégradation des ARNm. La séquestration des ARNm aberrants dans les P-Bodies permettrait la diminution rapide de leur quantité afin d'éviter la traduction accidentelle de protéines non fonctionnelles.

Il y a une corrélation inverse entre l'association d'un ARNm avec des polysomes et son accumulation dans les P-Bodies dans les cellules de mammifère (Bhattacharyya et al., 2006; Brengues et al., 2005; Pillai et al., 2005; Teixeira et al., 2005). Les fonctions des P-Bodies et des miARN semblent connectées. La délétion de Rck/p54 entraîne la perte des P-Bodies (Chu and Rana, 2006) et la dégradation des ARNm médiée par les miARN (Eulalio et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition globale de la biosynthèse des miARN affecte le nombre et la taille des P-Bodies dans les cellules HeLa (Behm-Ansmant et al., 2006a; Chu and Rana, 2006; Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005). La répression médiée par les miARN pourrait donc jouer un rôle central dans la formation des P-Bodies. Cependant, il semble clair que les P-Bodies ne sont pas absolument nécessaires au fonctionnement des miARN. En effet, l'intégrité des P-Bodies, affectée par l'absence de protéines telles que Dcp1:Dcp2, Lsm1 ou GW182, n'affecte pas la répression des ARNm par les miARN en culture cellulaire (Behm-Ansmant et al., 2006a; Chu and Rana, 2006). De plus, il a été montré que les miARN sont associés aux polysomes ce qui est incompatible avec la notion que les P-bodies sont nécessaires à la répression de la traduction par les miARN.

4.5) Liens entre les granules à ARN

Tous les granules à ARN contiennent des ARNm dont la traduction est réprimée. Cependant, les GCG et les granules neuronaux concentrent des ARN spécifiques alors que les P-Bodies et les granules de stress sont moins sélectifs. Les ARNm soumis aux mécanismes de dégradation *via* le NMD ou les ARE, et les ARNm ciblés par les si-miARN s'accumulent dans les P-Bodies. Les ARNm dont la traduction a été inhibée par un stress, à l'exception des ARNm codant pour les protéines dont la synthèse est induite par un stress (e.g. les protéines de choc thermique HSP), sont emmagasinés dans les granules de stress.

La composition de chaque catégorie de granules est différente et présente des protéines spécifiques constituant des marqueurs caractéristiques de chaque structure ou des protéines retrouvées dans plusieurs types de granules. FMRP, par exemple, a été identifiée dans les granules neuronaux et de stress. En plus de la sélectivité des ARNm, les granules contiennent ou excluent l'une ou l'autre, ou les deux, sous-unités ribosomiques. Alors que les granules neuronaux contiennent à la fois la petite et la grande sous-unité ribosomique, suggérant qu'elles accumulent des ARNm réprimés à l'étape d'élongation traduction, les granules de stress ne renferment que la petite sous-unité suggérant qu'elles rassemblent les ARNm bloqués au niveau de l'initiation ou de la terminaison de la traduction. Les P-Bodies ne contiennent ni les sous-unités ribosomiques, ni les facteurs d'initiation de la traduction à l'exception de eIF4E suggérant leur rôle dans la dégradation des ARNm. La composition protéique des granules, ribosomale en particulier, reflète donc leur fonction. Malgré ces différences, les P-Bodies et les granules de stress semblent constituer des sites de remodelage des mRNP ayant un lien fonctionnel (Kedersha et al., 2005). Bien que les P-Bodies existent dans les cellules à l'état basal, leur formation peut, tout comme les granules de stress, être induite par un stress. Le blocage de la traduction au niveau de l'étape d'initiation, à l'aide par exemple de la puromycine, provoque la déstabilisation des polysomes et induit une augmentation de taille des P-Bodies et des granules de stress alors qu'un blocage provoqué au niveau de l'étape d'élongation, à l'aide de cycloheximide qui retient les ARNm sur les polysomes bloquant ainsi les ribosomes en cours de traduction, induit la disparition des P-Bodies et inhibe la formation des granules de stress (Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004). Ces données suggérent un lien moléculaire entre les P-Bodies et les granules de stress. L'immuno-localisation des P-Bodies et des granules de stress a révélé la proximité physique de certains P-Bodies avec les granules de stress alors que d'autres sont libres dans le cytoplasme.

Malgré les progrès récents, peu de données sont disponibles sur les mécanismes impliqués dans la formation et la disparition des granules à ARN. Un défi majeur sera de comprendre ces mécanismes et d'identifier, pour chaque type de granule, la liste complète de leurs composés et le rôle de chacun d'eux.

PUBLICATION 1

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Service Commun de Documentation

FMRP and the G-quartets

Céline SCHAEFFER, Marie-Cécile DIDIOT, Zhaoxia TIAN, Bernard EHRESMANN, Chantal EHRESMANN and Hervé MOINE

In: Ying Ju Sung and Robert B. Denman. The Molecular basis of fragile X syndrome (chap. 5). Research Signpost, 2005, pages 51-64. ISBN: 81-7736-257-7

Publication 1 : pages 79-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/



OBJCTIFS DE L'ÉTUDE

Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la détermination des caractéristiques moléculaires de FMRP, sa fonction cellulaire exacte et les bases moléculaires à l'origine du syndrome de l'X fragile restaient mal comprises. De nombreuses études suggèrent l'implication de FMRP dans le métabolisme des ARNm, en particulier la régulation de la traduction, le transport des ARNm et leur dégradation. Suivant la caractérisation de FMRP comme protéine se liant à l'ARNm, il apparaissait important d'identifier les ARNm ciblés par FMRP, d'identifier leur(s) motif(s) reconnu(s) par FMRP et de comprendre comment FMRP agit sur leur régulation afin d'expliquer pourquoi, en son absence, la dérégulation de l'expression de ces ARNm conduit au syndrome de l'X fragile. Il a été montré au laboratoire, avant mon arrivée, que FMRP lie spécifiquement les structures de l'ARN en quartet de guanines (Schaeffer et al., 2001). Ces motifs ont été retrouvés dans plusieurs cibles ARNm de FMRP validées *in vivo* comme les ARNm *Fmr1* (Schaeffer et al., 2001) et *PP2Ac* (Castets et al., 2005) ainsi que dans de nombreuses cibles potentielles (Brown et al., 2001; Miyashiro et al., 2003).

Nous avons tout d'abord étudié l'impact de l'interaction entre FMRP et le quartet de guanines identifié dans son propre ARNm, *Fmr1*, sur le contrôle post-transcriptionnel : traduction, localisation et dégradation. Ce motif, précédemment caractérisé au laboratoire, est présent dans une séquence appelée "FMRP Binding Site" (FBS). Cette étude nous a conduit à analyser l'effet de l'interaction FMRP/FBS sur l'épissage alternatif de *Fmr1*. Nous avons ensuite étudié le rôle de l'interaction FMRP/G-quartet sur la régulation de la traduction. Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction avec les G-quartets du FBS puis, dans un deuxième temps, avec les G-quartets d'autres cibles ARNm de FMRP identifiées comme *PP2A* et *PSD-95*, dont nous avons vérifié la présence d'un G-quartet dans sa région 3' UTR et son interaction avec FMRP.

Le mécanisme d'ARN interférence représente l'un des mécanismes les plus importants dans la régulation post-transcriptionnelle. L'identification d'une interaction entre FMRP et la machinerie RISC avait conduit plusieurs laboratoires à émettre l'hypothèse d'un rôle de FMRP dans ce mécanisme. La validité de cette interaction et son rôle exact n'ayant pas été formellement établit, nous avons décidé de la vérifier. Nous avons tout d'abord comparé la localisation cellulaire de FMRP avec celle des P-Bodies, foci cytoplasmiques où s'accumulent les ARNm soumis au RISC, puis nous avons comparé la localisation polysomale de FMRP et d'Ago2, protéine essentielle du complexe RISC. Nous avons ensuite

évalué l'impact de FMRP sur l'activité RISC. Par ailleurs, nous avons également vérifié l'implication de FMRP dans le métabolisme des ARNm non traduits lors de situations où la traduction est bloquée et lors de la formation des granules de stress.

Finalement, dans le cadre d'une collaboration de notre laboratoire avec celui du Dr. Barbara Bardoni (CNRS, Nice), nous avons contribué à la caractérisation d'une nouvelle cible de FMRP, l'ARNm *Sod1*. Après constatation que l'ARNm *Sod1* ne contient pas de G-quartet, un nouveau motif cible de FMRP a été caractérisé, le "Stem-Loop Interacting with FMRP motif" (SLIP motif) dont nous avons montré qu'il module positivement, avec FMRP, la régulation de la traduction.

RÉSULTATS

I. ÉTUDE DU RÔLE DE L'INTERACTION FMRP/G-QUARTET SUR L'EXPRESSION GÉNIQUE

1. Rôle de l'interaction FMRP/FBS

1.1) Objectifs de l'étude

Il a été montré, avant mon arrivée dans le laboratoire, que FMRP lie spécifiquement une structures particulière de l'ARN, le motif en quartet de guanines (Schaeffer et al., 2001). La première cible de FMRP contenant ce motif identifiée est le propre ARNm de FMRP, *Fmr1*. Ce motif est localisé à l'extrémité 3' de la région codante de *Fmr1*, au niveau de l'exon 15, dans la séquence codant pour le domaine RGG de FMRP. La séquence minimale (100 nucléotides) formant ce motif et avec laquelle FMRP interagit avec une forte affinité, identique à celle pour l'ARNm entier, a été appelée FBS (FMRP Binding Site) (Schaeffer et al., 2001). Le but de cette étude a été de caractériser le rôle exact de l'interaction entre FMRP et le FBS sur le métabolisme de l'ARNm *Fmr1*. Nous avons déterminé l'impact de mutations dans le G-quartet sur le métabolisme global de *Fmr1*: son niveau de transcription, sa localisation cellulaire et polysomale et sa traduction. Aucune variation n'ayant été observée à ces différents niveaux, l'examen de la nature et la localisation de ce motif, proche de sites accepteurs d'épissage, nous ont conduits à étudier son rôle et celui de son interaction avec FMRP dans l'épissage de l'ARNm *Fmr1*.

1.2) Publication 2

Par une approche de mutagenèse dirigée dans l'ARNm *Fmr1*, nous avons caractérisé le site de fixation de FMRP, le FBS (FMRP Binding Site), et avons recherché son impact sur l'expression de *Fmr1*. Nous avons utilisé des mutations abolissant la formation du motif G-quartet sans affecter le code génétique. Nous avons montré que le FBS adopte deux structures G-quartets indépendantes avec lesquelles FMRP interagit avec la même affinité. Alors que l'interaction de FMRP sur ses ARNm cibles semble réguler leur traduction, nous avons montré que des mutations dans le FBS, supprimant la fixation de FMRP sur *Fmr1*, n'affectent pas sa traduction dans les modèles cellulaires utilisés. Par ailleurs, les mutations qui

abolissent la formation des G-quartets, n'affectent ni le niveau global, ni la localisation cellulaire et polysomale de l'ARNm *Fmr1*, ni le niveau d'expression de FMRP.

Nous avons alors recherché un effet possible sur l'épissage alternatif de *Fmr1*. En effet, l'ARNm *Fmr1* est l'objet d'épissage alternatif (Sittler et al., 1996) dont certains évènements conduisent, par un changement du cadre de lecture, à la production d'isoformes avec des différences au niveau de leur région C-terminale susceptibles de moduler leur fonction. L'exon 15, région dans laquelle est située le FBS, contient plusieurs sites accepteurs d'épissage. Nous avons étudié si la structure FBS a un effet sur l'efficacité de l'épissage et si l'interaction FMRP/FBS influe sur ce mécanisme. À l'aide d'un système de minigène, nous avons montré que le FBS est un site activateur d'épissage exonique. De plus, l'épissage alternatif de *Fmr1* est affecté par le niveau intracellulaire de FMRP. Ainsi, l'interaction entre FMRP et le FBS serait capable d'influencer le choix des sites d'épissage de l'exon 15 et donc l'équilibre entre les isoformes longues et courtes de FMRP. Ces résultats suggèrent que les G-quartets présents dans l'ARNm *Fmr1* pourraient agir comme éléments de contrôle de l'épissage alternatif dans une boucle d'autorégulation.

PUBLICATION 2

OXFORD JOURNALS



Nucleic Acids Research

The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer Marie-Cécile Didiot, Zhaoxia Tian, Céline Schaeffer, Murugan Subramanian, Jean-Louis Mandel and Hervé Moine *Nucleic Acids Res.* First published online 24 Jul 2008; doi:10.1093/nar/gkn472

Supplement/Special Issue This article is part of the following issue: "Supplementary Data"

http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkn472/DC1

The full text of this article, along with updated information and services is available online at

http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkn472v1

References This article cites 37 references, 19 of which can be accessed free at

http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkn472v1#BIBL

Supplementary material Data supplements for this article are available at

http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gkn472/DC1

Reprints Reprints of this article can be ordered at

http://www.oxfordjournals.org/corporate_services/reprints.html

Email and RSS alerting Sign up for email alerts, and subscribe to this journal's RSS feeds at http://nar.oxfordjournals.org

PowerPoint® image downloads

Images from this journal can be downloaded with one click as a PowerPoint slide.

Journal information Additional information about Nucleic Acids Research, including how to subscribe can be found at

http://nar.oxfordjournals.org

Published on behalf of Oxford University Press

http://www.oxfordjournals.org

Nucleic Acids Research, 2008, **1–11** doi:10.1093/nar/gkn472

The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer

Marie-Cécile Didiot, Zhaoxia Tian, Céline Schaeffer, Murugan Subramanian, Jean-Louis Mandel and Hervé Moine*

IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Inserm U596, CNRS UMR7104, Université Louis Pasteur, Collège de France, Illkirch, F-67400 France

Received May 9, 2008; Revised June 30, 2008; Accepted July 7, 2008

ABSTRACT

The fragile X mental retardation protein (FMRP) is a RNA-binding protein proposed to posttranscriptionally regulate the expression of genes important for neuronal development and synaptic plasticity. We previously demonstrated that FMRP binds to its own FMR1 mRNA via a quanine-quartet (G-quartet) RNA motif. However, the functional effect of this binding on FMR1 expression was not established. In this work, we characterized the FMRP binding site (FBS) within the FMR1 mRNA by a site directed mutagenesis approach and we investigated its importance for FMR1 expression. We show that the FBS in the FMR1 mRNA adopts two alternative G-quartet structures to which FMRP can equally bind. While FMRP binding to mRNAs is generally proposed to induce translational regulation, we found that mutations in the FMR1 mRNA suppressing binding to FMRP do not affect its translation in cellular models. We show instead that the FBS is a potent exonic splicing enhancer in a minigene system. Furthermore. FMR1 alternative splicing is affected by the intracellular level of FMRP. These data suggest that the G-quartet motif present in the FMR1 mRNA can act as a control element of its alternative splicing in a negative autoregulatory loop.

INTRODUCTION

The most frequent cause of inherited mental retardation, fragile X syndrome, is caused by the absence of the RNA-binding protein Fragile X Mental Retardation (FMRP).

In neurons, FMRP is associated with a limited subset of brain mRNAs together with other proteins within large ribonucleoparticles, the composition of which is still incompletely known (1–3). Within these mRNPs, FMRP is proposed to act as a regulator of translation or transport of specific target mRNAs. However, the molecular mechanisms of FMRP action on specific target mRNAs are still poorly understood. As a clue to the function of FMRP, the study of its mRNA targets appears an essential step. The guanine-quartet (G-quartet) structural motif was identified as a high affinity determinant of the interaction of FMRP with mRNAs (4,5). RNA G-quartet is not the only proposed target of FMRP since U-rich sequences (6), a kissing-loop motif (7) and the BC-1 RNA (9) were also found to mediate the interaction of FMRP with mRNAs. However, FMRP target mRNAs bearing the kissing-loop motif have not yet been identified and the interaction mediated via BC1 is under debate (8). Thus, at present, G-quartet still appears as a main consensus motif found in mRNAs of mammalian genes found associated with FMRP (10,11), and/or demonstrated to be affected by the absence of FMRP. Genes carrying potential or verified G-quartets include the microtubule associated protein 1B MAP1B (12), the post-synaptic density protein PSD95 (13,14), the catalytic subunit of protein phosphatase 2A (PP2Ac) (15), or the amyloid precursor protein APP (16), all important for neuronal development and synapse plasticity. However, the role of the FMRP/ G-quartet interaction remains unclear as no direct evidence of its effect on post transcriptional control has been provided up to now and recent work indicated that the association of FMRP with polyribosomes (17) would not be mediated by G-quartets (7).

To address these questions, we analyzed in this work the interaction between FMRP and its own mRNA, FMR1, one of the best characterized targets of FMRP where the G-quartet motif had been identified (2). Because the

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

^{*}To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 8865 3258; Fax: +33 3 5565 3246; Email: moine@igbmc.u-strasbg.fr Present address:

Céline Schaeffer, Department of Neurobiology and Genetics, Dulbecco Telethon Institute, Molecular Genetics of Renal Disorders Unit, Dibit-San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

^{© 2008} The Author(s)

interaction between FMRP and its own mRNA was suggestive of an autoregulatory loop, we tested whether FMRP could control its own expression. To determine the function of the FMR1 mRNA/FMRP interaction, we performed mutations within the G-quartet motif of the FMRP binding site (FBS) of FMR1, which abolished FMRP binding in vitro without changing the amino acid sequence of the protein and we examined at which level the FMRP/FBS interaction could play a role. Our data provide several lines of evidence for a role of the FBS and its binding to FMRP in alternative splicing regulation of the FMR1 gene.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and constructions

Plasmid pTL1 (18) was used to transiently or stably express FMR1 longest isoform 1 in the various cell lines described in text. Flag and cMyc tags were introduced in frame at N-terminus of *FMR1* to give pTL1-Flag-*FMR1* and pTL1 cMyc-FMR1. Mutations disrupting G-quartet within the FBS were introduced into pTL1-Flag-FMR1 using Quick Change Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA). Primers used for mutagenesis are given in Supplementary Material available online. The SXN13 minigene constructions (19) were produced by inserting dsDNA fragments of FBS within exon 2 using Sall/ BamHI sites. Plasmid pTAP-FMRP was constructed by inserting FMR1 Iso1 in frame at its N-terminus with TAP tag of pBS 1539 (20) into MluI site of pTRE2 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA).

Cell culture and transfections

HeLa cells and $FMR1^{-/-}$ mouse embryonic immortalized fibroblasts (21) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μg/ml penicillinstreptomycin. PC12 Tet-On cells (Clontech) were grown in RPMI supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 125 µg/ml hygromycin, 100 µg/ml of penicillin–streptomycin, in a 5% CO₂ incubator at 37°C. PC12 Tet-On cells were stably transfected with pTAP-FMRP using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer recommendations. The pHyg resistance vector was used in the cotransfection as a selection marker. Transfected cells were cultured in medium containing 125 µg/ml hygromycin and 1 µg/ml doxycyclin, and individual double stable selected cells were tested for the presence of the TAP-FMRP fusion protein by western blot using 1C3 anti-FMRP. PC12 Tet-On clone '1' was selected for its tight regulation of TAP-FMRP expression. To induce exogenous human FMRP Iso1 expression in stably transfected cell lines, doxycyclin was added to cells to a final concentration of 250 ng/ml for 48 h.

For the determination of SXN minigene splicing efficiency, HeLa cells or FMR1^{-/-} mouse embryonic immortalized fibroblasts at 40% confluency were transfected with 1.5 µg SXN vector using JetPEI (Polyplus) in 60 mm diameter plates. After 24 h, total RNA was extracted using Genelute mammalian total RNA kit

(Sigma, Steinheim, Germany) and 5 µg was used for extension with the SXN primer described below.

Primer extension

Primer extensions to detect G-quartet structure within RNAs were performed as described in (4) using primer 5'-TCCATCTGTTGTTCTCCTTT for *FMR1* and 5'-AGAACCTCTGGGTCCAAGGGTAG for **SXN** minigene Exon 2.

RNA-binding assays

RNA-binding assays were performed using RNAs T7 in vitro transcribed labeled with $[\alpha^{-32}P]ATP$. Affinities were determined using competition gel shift assays with GST-FMRP as described previously (4). Briefly, ³²P-labeled FMR1 mRNA fragment N19 encompassing the FBS was incubated with 0.1 pmol GST-FMRP in the presence of increasing concentrations of unlabeled N19 or mutant N19- Δ G4 competitor RNA.

Polysomes preparation

Polysomes were prepared from four 10 cm diameter confluent HeLa cell plates. Twenty minutes before harvest, 90 µg/ml cycloheximide was added to cultures. Cells were lyzed in 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 U/ml RNasin (Promega, France), 1 mM DTE, 0.5% NP40 at 4°C. Supernatant of 10 min centrifugation at 13 000 r.p.m. was loaded onto 15-45% sucrose gradient run 2 h at 36 000 r.p.m. at 4°C. Polysomal fractions were precipitated with 0.1 M NaCl and 2.5 vol. ethanol and the mRNAs from these fractions were purified with GenElute Mammalian Total RNA kit (Sigma).

In situ hybridization

In situ hybridization were performed as described in (22) using oligonucleotide modified with fluorophore CY3 (GE Healthcare, France) and directed against the Flag sequence of exogenous FMR1 (5'-CTTGTCATCGTCG TCCTTGTAGTCCATGAATTCGCCCTATA).

Western and northern blots

Immunoblot analyses were performed with 1C3 antibody (1/2000), anti-Flag (1/1000 Sigma), anti-cMyc (1/500, Ozyme, France) and anti- β actin (1/1000) as described (18).

Northerns were performed according to (23). Radioactive probes were prepared using kit 'dsDNA all-inone-random-prime' (Sigma) with FMR1-3' UTR and 28S rRNA encoding cDNAs.

Real-time PCR

Total RNA (1 µg) prepared with Genelute mammalian total RNA kit (Sigma) was retrotranscribed with Superscript^{III} (Invitrogen) using random priming, and real-time PCR were performed using the Brilliant SYBR-Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene) on MX4000 apparatus (Stratagene). The following oligonucleotides were used for qRT-PCR.16Ra 5'-GTGGACGATTATC TGTTCGGGAA, R15/16 5'-CGTCGTTTCCTTTGAA GCC, P14/15F 5'-GATATACTTCAGGAACTAATTC,

p14/15.1F 5'-GATATACTTCAGCTCCAACAG, p14/ 5'-GATATACTTCAGAATCTGACC, 11/13F 5'-CAAAAGTCCAGAGGGGGATG, 5'UTR-FMR1.F 5'-GCGAGGAAGGACGAGAAGAT, 5'UTR-FMR1.R 5'-TGGTGGGAATCTCACATCATGG, R13/15 5'-CA GAATTAGTTCCTTTAAGTAG, R13/15.1 5'-GTGGT CAGATTCTTTAAGTAG, R13/15.2 5-CTGTTGGAG CTTTAAGTAG, F-GAPDH 5'-GGATGCAGGGATG ATGTTC and R-GAPDH 5'-TGCACCACCAACTGC TTAG.

2D-PAGE

Protein extraction and first dimension: cells were harvested by centrifugation and resuspended in 10 mM Tris, 1 mM EDTA and 250 mM sucrose. Lysis was performed with rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% ampholytes, 20 mM DTT). DNA was eliminated by 3 min sonication. A total of 100 µg of proteins were diluted in 135 µl of rehydratation buffer, which were used to rehydrate Biorad ReadyStrip IPG pH 3-10 strips. Isoelectric focusing 30 min at 500 V and 250 Vh, 30 min at 1000 V and 500 Vh and 1 h at 4000 V and 8000 Vh using the MultiphorII system (GE Healthcare). Second dimension: strips were equilibrated for 20 min in 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 50 mM DTT. Strips were placed on vertical 1.0 mm 10% SDS polyacrylamide gels and sealed with 0.5% agarose sealing solution. Electrophoresis was performed in standard running buffer at 150 V for 1 h.

RT-PCR

Total RNA was prepared from cortices of 10 days old wild-type (Wt) or FMRP^{-/-} male mice using Trizol reagent (Invitrogen) followed by RNeasy purification (Qiagen, Hilden, Germany) and their synaptoneurosomal fractions were prepared according to (24). Total RNA (1 μg) was retrotranscribed with Superscript^{III} (Invitrogen) using random priming. One microliter of RT reaction (1/10) was used to perform PCR reactions in 25 µl reaction volume with the following primers: F13 5'-GTGGGAACAAAAGACAGCATCG, R15 5'-CCT CTGCGCAGGAAGCTC, R4 CACCAACAGCAAG GCTCTTT, F2-3 5'-TTGAAAACAACTGGCAACCA, F-GAPDH and R-GAPDH. Reactions were performed as follows, initial denaturation 3 min at 95°C, then 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C, with 40 cycles.

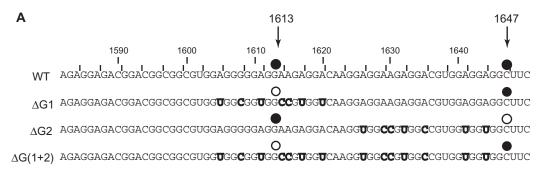
RESULTS

The FBS contains two independent G-quartet structures stabilized by adenines

FMRP specifically binds to its own mRNA both in vitro (4,25,26) and in cells (27). The binding site of FMRP on its mRNA, here called the FBS, consists of a G-quartet motif present in the C-terminal coding region of FMR1 mRNA (4). The G-quartet motif is formed by the stacking of several guanine tetrad units. Adenines were also suspected to contribute to the structure in the FBS by forming intercalating adenine quartets. To investigate the function of the interaction between FMRP and its own mRNA, we constructed a series of mutants to inhibit FMRP/FBS interaction by disrupting the G-quartet structures. Previous work had suggested the presence of two distinct G-quartet structures (4). To test this hypothesis, two sets of mutations were constructed to disrupt either one or both potential structures, called $\Delta G1$ and $\Delta G2$ (Figure 1A). In a first step, mutations were essentially substitutions of As to Cs and Us at the wobble position of codons to preserve the encoded FMRP protein sequence and to test the contribution of adenines. The presence of G-quartets in the RNAs was indicated by the presence of potassium-dependent stops of reverse transcription as previously described (4). $\Delta G1$ mutation, located around position 1613, suppressed the 1613 (G1) stop while the stop at position 1647 (G2) remained unchanged (Figure 1B). Conversely, $\Delta G2$ mutations had the opposite effect, with the 1613 stop unchanged and the stop 1647 suppressed. These results indicate that two independent G-quartet structures exist in the FBS. Moreover, because the mutations left the guanine content of the FBS essentially unchanged while substituting several adenines, our results support a role for the adenines in stabilizing both FBS G-quartets. This stabilization effect can be explained by the formation of A-tetrads stacking within the G-quartet structure as previously proposed (4). When both sets of mutations were combined in mutant $\Delta G(1+2)$, the stop at position 1647 reappeared while the stop at position 1613 remained absent (Figure 1B). The reappearance of a G-quartet structure at G2 position within the $\Delta G(1+2)$ RNA despite the presence of mutations $\triangle G2$ could be explained by the fact that the double mutant generated a different and more stable G-quartet structure because the G-content was essentially not affected by the mutations.

FMRP binding to its own mRNA has no impact on FMR1 translation

We tested next the ability of these different mutant RNAs to interact with FMRP by gel shift assay as previously described (4). The mutant RNAs ($\Delta G1$ and $\Delta G2$) bound to FMRP with the same affinity as for the Wt FBS (data not shown). This indicated that FMRP equally binds one or the other structure. To completely disrupt G-quartet formation within FBS, a new set of mutations, consisting essentially of A to C substitutions at the wobble position of codons and favoring hairpin structures, was performed (Figure 2A). The mutations were inserted in full length FMR1 mRNA and the disruption of the G-quartet structure was confirmed by reverse transcriptase (RT) elongation test (Figure 2B). We have shown previously that a 425-long RNA fragment (N19) of FMR1 mRNA containing the FBS recapitulated a Wt-binding efficiency (4). To confirm the loss of interaction of FMRP on $\Delta G4$ -FBS, the mutations were inserted also in the N19 fragment (N19- Δ G4) and its interaction with FMRP was tested using gel shift assay (Figure 2C). The binding efficiency of N19-ΔG4 RNA was found to be decreased by more than a 100-fold compared with Wt N19 RNA (Figure 2D). This level of interaction,



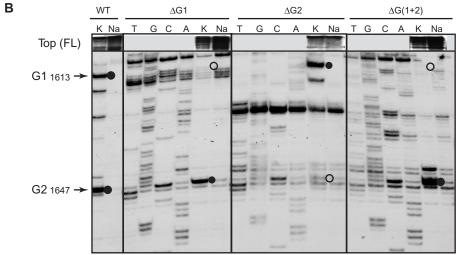


Figure 1. Presence of two independent G-quartets in FBS. (A) Sequence of Wt and mutants (Δ G1, Δ G2, Δ G1+2) FBSs. The mutations are indicated in bold. The position of the two major stops of RT at 1613 and 1647 (+1 being A of start codon), in presence of 150 mM KCl, are shown. The circles above the sequences indicate the status of RT stop as determined in (B) (black circle, stop; open circle, absence of stop). (B) Autoradiograph of reverse transcriptions performed on full-length Wt or mutant FMRI mRNA constructs and after separation on denaturing PAGE (see Material and methods section for details). The cation-dependent arrests at positions 1613 and 1647 reveal the 3' edges of two distinct G-quartet structures. Lanes K and Na: extensions performed with 150 mM KCl and NaCl, respectively. The position and status of RT stops is shown with the circles as in (A). Sequencing lanes for mutants are shown. The full-length extension products seen on upper part of gel (top) reflects the strength of the different G-quartet structures.

in the micromolar range, was assigned to nonspecific binding as previously determined (4).

The impact of the disruption of G-quartet structures within the FBS was then analyzed in various cell types [HeLa, Cos-7, and fibroblasts from $FMR1^{-/-}$ mice (21)] by transiently or stably expressing FMR1 bearing $\Delta G4$ mutation. In these cells no difference in FMRP protein level could be detected between the cells expressing Wt or $\triangle G4 \ FMR1$ (Figure 3A). Also, no difference could be detected between Wt and mutant FMR1 mRNA levels (Figure 3B). Furthermore, although mRNAs bearing G-quartets had been reported to be differently associated with polyribosomes in the absence of FMRP (10), we could not detect a change in the association of ΔG4-FMR1 mRNA with polysomes both in HeLa and in $FMR1^{-/-}$ mouse fibroblasts (Figure 3C). Finally, we did not observe any significant difference between Wt and ΔG4 FMR1 mRNAs localization in HeLa cells (Figure 3D). Thus, we concluded that the interaction between FMRP and the FBS had no detectable impact on FMR1 mRNA stability, translation and localization in the tested cells.

The FBS is a potent exonic splicing enhancer

A number of facts brought us to examine next a potential implication of the FBS in splicing. Firstly, the FBS is located nearby to alternatively spliced sites of *FMR1* (Figure 4A). Secondly, because of its high purine content, the sequence of the FBS has analogies to an ESE consensus (28). Third, because of its shuttling activity, FMRP has been proposed to bind mRNAs already in the nucleus and therefore should be able to interact with pre-mRNAs (29.30).

The ability of the FBS to act as an ESE in vivo was tested by using the SXN13 minigene system (19) derived from the β -globin gene and composed of four exons, one of which (exon 2) being alternatively spliced (Figure 4B). The presence in exon 2 of a sequence with ESE properties (12MU3) induced exon 2 inclusion and resulted in a longer mRNA product (Figure 4C and E). A fragment of the FBS still able to form a G-quartet structure or its corresponding Δ G4 mutant was inserted within the second exon of the minigene to determine its ESE properties (Figure 4C and D). After transient transfection in HeLa cells of the plasmids bearing the different

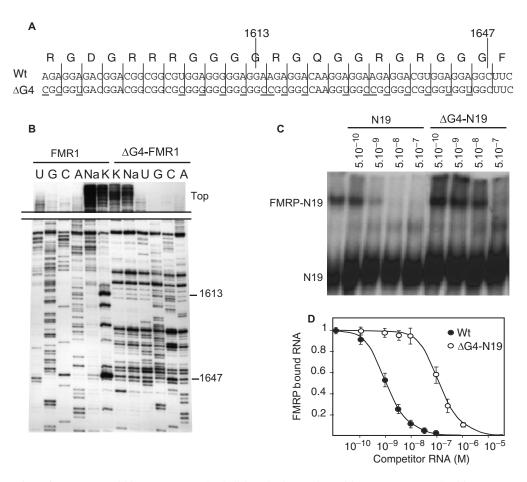


Figure 2. The disruption of G-quartets within FMR1 mRNA abolishes the interaction with FMRP. (A) Nucleotide sequences of the Wt or the G-quartet-less FMR1 mutant construction ($\Delta G4$) with its amino acid sequence. Underlined nucleotides indicate the nucleotides mutated in $\Delta G4$. (B) Cation-dependent arrest of reverse transcription showing the absence of G-quartet in ΔG4 'full-length' FMR1 mRNA. (C) Competition experiments to compare the relative binding strength of FMRP for a 425-nt long RNA fragment encompassing the Wt FMRP binding site N19 and the mutant Δ G4-N19 by gel shift assay. Lane '-' is control without competitor RNA. Position of free and FMRP-complexed ³²P-labeled N19 RNA is shown. The molar concentration of unlabeled competitors is given at the top of figure. (D) Graph depicting the fraction of bound labeled N19 RNA plotted against competitor RNA concentrations as determined from C. Each point is the mean with standard deviation of at least three independent experiments.

minigene constructions, RT elongation was directly performed on the total RNA extracted from the cells using a 5' end ³²P-labeled oligodeoxynucleotide priming within exon 3 of the minigene. The ESE properties of the FBS fragment were evaluated by measuring the ratio between the long RT product (bearing exon 2) and the short RT product (without exon 2) of the alternative splicing of the globin minigene. While the 12MU3 sequence was capable to specify exon 2 inclusion in about 80% of the splicing events (Figure 4E), the G4-FBS fragment induced a complete inclusion of the exon 2. Meanwhile, exon 2 was totally excised in $\Delta G4$ -FBS mutant. These data indicated that the FBS had potent exonic splicing enhancing properties on a minigene and these properties were linked to its ability to form a G-quartet structure.

The overexpression of one FMRP isoform alters FMR1 alternative splicing pattern in PC12 cells

The fact that the FBS had a potent ESE activity in a minigene suggested that FMRP could regulate its own splicing by binding to FBS. To verify this hypothesis, we first tested whether the splicing efficiency of a globin minigene bearing the FBS fragment could be influenced by FMRP. Splicing of SXN13-G4-FBS minigene was analyzed in $FMRI^{-/-}$ mouse fibroblasts (21). In these cells, the expression of either FMRP major cytoplasmic isoform 7 or nuclear isoform 6 (18) by transient or stable transfection, had no detectable influence on SXN13-G4-FBS expression (data not shown). An absence of effect of FMRP on the minigene system could be due to the fact that the FBS was out of its natural context or had a too strong ESE effect on minigene splicing.

We then tested the influence of an overexpression of FMRP on FMR1 pre-mRNA splicing. The FBS is located close to two alternative splice sites within exon 15 of FMR1. The 3' side of the FBS is located 110, 74 or 35 nucleotides downstream of the three different acceptor 5' ends of exon 15 (4.31). The alternative splicing occurring at these three sites leads to six types of exon 15 variants, depending whether exon 14 is skipped or not. These three acceptor sites are used in different proportions in various

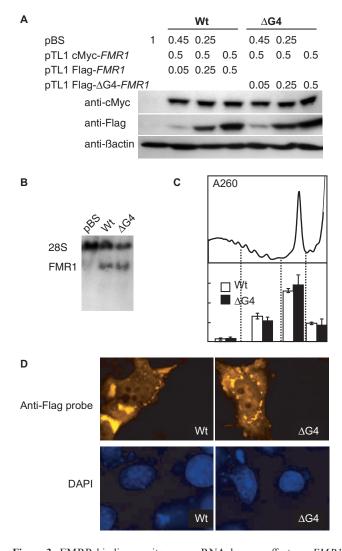


Figure 3. FMRP binding on its own mRNA has no effect on FMR1 translational regulation. (A) Western blot analysis of pTL1 Flag-FMR1 and pTL1 Flag-\DeltaG4-FMR1 expression in HeLa cells. HeLa cells (6×10^6 cells) were transfected with the indicated amount plasmids (μg). Westerns blot on 15 μg total cell extracts using anti-cMyc, anti-Flag and anti-Bactin antibodies, revealed no difference between Wt and mutant $\Delta G4$ -FMR1 encoded protein levels (one of three independent experiments is presented, P < 0.05, similar results were obtained in Cos-7 and in FMR1^{-/-}fibroblasts). (B) Northern blot analysis of FMR1 mRNA expression level with 15 µg of HeLa cell total RNA extracts using probes specific of pTL1 encoded FMR1 mRNAs and of 28S rRNA as internal control. The pBS is control lane without FMR1 encoded plasmid. No difference is observed between Wt and $\Delta G4$ expression levels. (C) Localization of Wt and mutant $\Delta G4$ FMR1 mRNAs in polyribosomes of HeLa cells. In the upper part is depicted a typical profile of polyribosomes separated on a 15-45% linear sucrose gradient registered at 254 nm optical density. The lower graphic represents the quantification by qRT-PCR of the FMR1 mRNA in the indicated pooled fractions using GAPDH mRNA as internal control. No significant difference was observed between Wt and $\Delta G4$ -FMR1 mRNAs in their localization in the different ribosome subsets. Similar results were obtained in the $FMR1^{-/-}$ cells. (D) Intracellular localization of Wt and $\Delta G4$ mRNAs by fluorescence in situ hybridization in HeLa cells. Cy3 labeled anti-Flag oligo-deoxynucleotide probe (Flag) revealed a similar cytoplasmic and perinuclear localization for both mRNAs. DAPI staining of the nuclei is shown.

tissues (32) suggesting the possibility of regulation at this level. Because the FBS is highly conserved (4) we tested the possible impact of FMRP/FBS interaction in rat cells. Rat phaeochromocytoma PC12 cells stably transfected with a tagged human isoform 1 FMRP (iso-1h) under the control of the inducible promoter Tet-On were used (PC12-1' cells). We tested in these cells, the effect of iso-1h FMRP increase on endogenous (rat) FMR1 mRNA alternate splicing. Upon induction of iso-1h expression (Figure 5A) by doxycyclin treatment of the cells, the total amount of FMR1 mRNAs (rat + human) was found increased over 30-fold compared to its basal level in PC12 cells (Figure 5B left). Meanwhile, the global level of endogenous FMR1 mRNAs (rat) was not affected (Figure 5B right). The splicing events taking place around the FBS site within the endogenous FMR1 were analyzed by qRT-PCR using rat specific primer sets (Figure 6A). Our data showed that the products of exon 15 first acceptor site usage (including the longest isoform 1, the most frequent isoform 7 and isoforms 13 and 17) were decreased over 2-fold (Figure 6B). This decrease was concomitant with an increase in minor isoforms, products of exon 15 second and third acceptor site usage (1.4- and 1.8-fold respectively), including the minor isoforms 2, 3, 8, 9, 14, 15, 18 and 19. Thus, the overexpression of the full-length FMRP isoform alters FMR1 splicing events around the FBS in a manner that indicates a displacement of the equilibrium between major and minor isoforms. These data are in agreement with the hypothesis that FMRP binding to the FBS plays a role in regulating FMR1 splicing.

We examined also the splicing events leading to exon 14 skipping. Upon overexpression of the full-length FMRP, all transcripts lacking exon 14 were found decreased by 2-fold. Although the splicing events leading to exon 14 skipping are likely in relationship with those occurring between exons 14 and 15, they are quite rare events compared with the latter [(26) and our data not shown]. To confirm the alterations of FMR1 expression seen at the RNA level upon iso-1h overexpression, we analyzed FMRP isoform expression by western blotting after 2D PAGE. The use of monoclonal anti-FMRP 1C3 antibody (recognizing an N-terminal epitope) indeed revealed significant differences in FMRP isoforms upon iso-1h overexpression (Figure 6C). The identification of each protein spot is however extremely difficult due to the complexity of splice products. The highest product visible only in iso-1h expressing cells (Figure 6C, right, spot a) could correspond to the exogenous iso-1h transferred inefficiently due to its higher molecular weight. Spots b and d, which showed a broadening in the PC12-1' cells compared to PC12, likely contained several isoform species of similar molecular weight. The origin of spot c, which appeared in PC12-1' cells was unknown. Most remarkable is the decrease of spot f, which could correspond to the shortest FMRP isoforms 10 and 11 (48 and 47 kDa respectively) that were found decreased at mRNA level. Altogether, these data showed that an overexpression of one FMRP isoform was able to alter FMR1 alternative splicing pattern both at RNA and protein level.

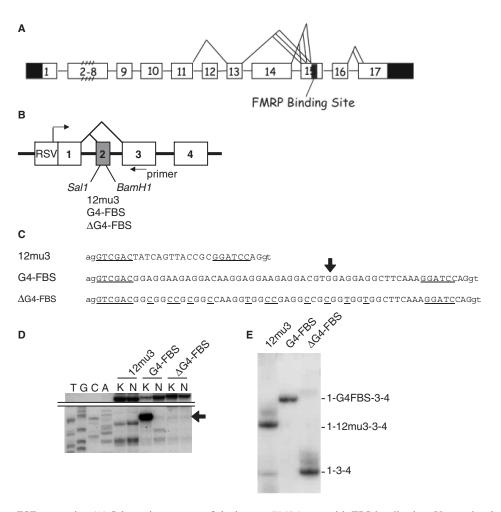


Figure 4. The FBS has ESE properties. (A) Schematic structure of the human FMR1 gene with FBS localization. Untranslated regions are indicated in black and alternative splices are shown. (B) Schematic structure of the SXN13 minigene. RSV and Rous sarcoma virus promoter. (C) Sequence of the constructions inserted in the Sal1 and BamH1 sites of SXN13 minigene exon 2. The sequence 12mu3 is a moderate ESE in vitro selected (19). G4-FBS is a minimal fragment of FBS still able to form a G-quartet structure (see B hereafter). Δ G4-FBS is the corresponding mutant with genetic code preserved and G-quartet disrupted. The intron sequence is in lowercase and the exonic sequence is in uppercase. The SalI and BamHI sites are underlined. (**D**) In vitro analysis by reverse transcription of the presence of a G-quartet in SXN13 G4-FBS pre-mRNA but not in ΔG4-FBS. The RNAs were produced by T3 transcription and G-quartet formation was assayed by the RT elongation test as in Figure 1B. Lane K and N: extensions were performed with KCl and Na, respectively. The top of the gel with full-length extension products is shown. (E) Efficiency of splicing of SXN13 G4-FBS and ΔG4-FBS minigenes in HeLa cells. Primer SXN extensions were performed with RT on 5 μg total mRNA extracted from HeLa cells transfected with the different SXN13 minigene constructions. Results shown are visualized by autoradiography after migration on denaturing PAGE. The exonic content of the different transcripts is indicated.

The splicing pattern of FMR1 exon 15 is altered in the cortex of $FMR1^{-/-}$ mice

Following the observation that an overexpression of FMRP in cells leads to an alteration of its splicing at exon 15, we tested next whether the absence of FMRP could lead to similar defects. Thus, we analyzed the splicing pattern of FMR1 mRNAs in Wt and $FMR1^{-/-}$ mice where FMRP protein is absent but FMR1 mRNA is still expressed. FMR1-/- mice have been produced by the insertion of a neomycin cassette within exon 5 (33). The exon 15 splicing events were analyzed by RT-PCR (Figure 7A) on total RNA extracted from cortices of 10-days old Wt and $FMR1^{-/-}$ mice as well as in the synaptoneurosomal fractions (SN) of these extracts where FMRP function is considered to be prominent (34). In parallel, RT-PCRs were also performed on another part of FMR1 mRNA (exon 3, Figure 7D) and on GAPDH mRNA (Figure 7E) for normalization. As previously reported, while FMRP protein expression was abolished in (Figure 7C), FMR1 mRNA remained expressed, although reduced to about 65% of Wt level (Figure 7A and 7D, compare lanes 3 to 4 and 5 to 6), possibly due to NMD events. RT-PCR performed across exon 15 (Figure 7A) revealed three bands corresponding to the three isoforms produced by the alternative branching of exon 14 and exon 15. Not surprisingly the isoforms lacking exon 14 are not detected in these PCR conditions because they are much less frequent events (26). Comparison of Wt and $FMR1^{-/-}$ exon 15 RT-PCR products (Figure 7B) revealed a marked difference concerning



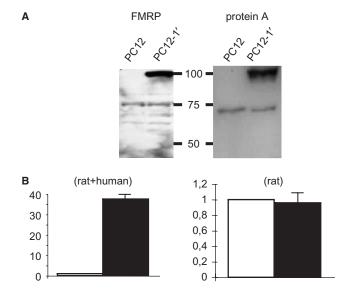


Figure 5. The overexpression of exogenous *FMR1* isoform 1 within PC12 cells does not affect the total level of endogenous *FMR1* mRNAs. (A) Right (1C3), western blot analysis of FMRP expression in normal PC12 cells (PC12) and in PC12 expressing a tagged human FMRP isoform (PC12-1') after doxycyclin induction. Left (Protein A), control western blot with TAG specific antibody to reveal the absence of degradation or abortive product in PC12-1' extracts. (B) qRT–PCR data comparing the level of total (endogenous rat + exogenous human) and endogenous (rat) *FMR1* mRNAs in the PC12 (white bar) and PC12-1' cells (black bar). Data are the means from qRT–PCR triplicates using at least two independent RNA preparations. PC12 values were arbitrarily set to 1. Normalization was performed using the internal standard GAPDH.

the smaller products that correspond to minor spliced mRNAs variants. Thus, these exon 15 minor splices disappeared in $FMRI^{-/-}$, both in total cortical extracts and in SN fractions (Figure 7A lanes 4 and 6). These data indicate that FMRP absence alters the splicing pattern of FMRI exon 15 in the cortex. While an overexpression of FMRP led to an increase of exon 15 minor splices, the absence of FMRP had the opposite effect. Altogether these data support a role for FMRP in the control of its own splicing at exon 15.

DISCUSSION

In this work, we analyzed the functional impact of the interaction between FMRP, the protein absent in the fragile X syndrome and the binding site identified in its own mRNA (4). We previously demonstrated that the FBS is located within the region encoding the RGG domain of FMRP. One main structural feature of this site is its ability to adopt a guanine quadruplex or G-quartet motif. We showed here that the structure of the FBS was more complex than initially thought. Thus, we identified two independent G-quartet structures in the FBS. Mutations that abolished either one or the other structure (mutant Δ G1 and Δ G2) had no impact on FMRP binding efficiency in the context of a 425-nt long fragment (N19), indicating that FMRP can indistinctly bind to either one or the other structure. Furthermore, we showed that

several adenines of the FBS play a role in the differential stability of the G-quartet structures, supporting the initial hypothesis that the structure involves intercalating adenine quartets (4) and as already observed for other Gquartet structures (35). Substitution of these adenines by pyrimidines does not however prevent formation of a G-quartet structure within the FBS and does not affect binding to FMRP in vitro. The elimination of both structures (mutant $\Delta G4$), while keeping the encoded protein sequence unchanged, dramatically reduced FMRP binding to a non specific level and confirmed the absolute requirement for a G-quartet for efficient binding. We then tested the impact of mutation $\Delta G4$ within the context of full FMR1 mRNA in cells. Surprisingly, no effect of G-quartet absence could be detected neither on mRNA translation and localization nor on polyribosomes association in HeLa cells. Thus, these observations do not support a role in a translationally controlled autoregulatory loop of the binding of FMRP to its own mRNA as initially proposed (4). The fact that the FBS site is purine-rich and localizes close to alternative splicing sites was suggestive of its potential function as a splicing regulator of FMR1. Indeed, mammalian ESEs were identified initially as purine-rich sequences that associate with specific SRfamily proteins and promote the utilization of adjacent splice sites (28). When a fragment of the FBS that retained its ability to form a G-quartet was tested in a minigene system, a strong exonic splicing enhancer activity was observed. This activity was completely abolished in a mutant that had lost its ability to form the G-quartet although it kept a G-rich sequence ($\Delta G4$). Thus, our data indicate that the FBS is a potent ESE and interestingly, the ESE activity of FBS seems to rely on its ability to adopt a G-quartet structure. These data suggest that the FBS may be a control element of FMR1 alternative splicing and the binding of FMRP could play a role in the control. Indeed, we showed that the equilibrium between short and long FMRP isoforms produced by exon 15 alternative splicing is altered by manipulating the level of FMRP protein (either by overexpression of the longest isoform 1 or in FMR1 KO cells where the FMR1 mRNA is still expressed). This supports the idea that FMRP binding to the FBS site controls the ratio between the different isoforms in an autoregulatory loop. The binding of FMRP longest isoform 1 on the FBS could counteract or modulate its ESE function (for instance by interfering with SR proteins) such as to favor the minor site inclusion. The two alternative G-quartet structures are equidistant (39 and 36 nt respectively) from the two alternative splicing sites in exon 15, suggesting that they could act as a molecular switch for controlling exon 15 alternative splicing. However, one cannot exclude at present that the observed effect of FMRP on the alternative splicing of its own mRNA may be indirect, involving for instance the translational control by FMRP of splicing factors.

The biological significance of a modulation of FMR1 alternative splicing is presently unclear in particular because it is not known whether the different isoforms of FMRP, some of which being present in very low amount, have different functions. Still a variation in their ratio is likely to have implication for the function

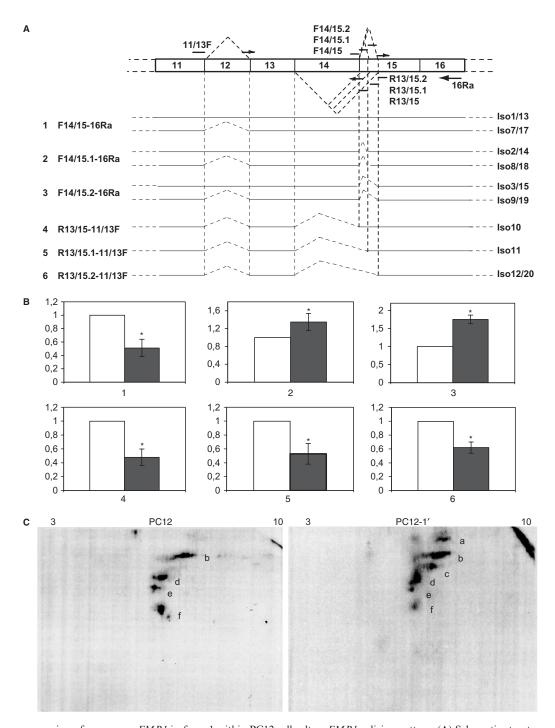


Figure 6. The overexpression of exogenous FMR1 isoform 1 within PC12 cells alters FMR1 splicing pattern. (A) Schematic structure of FMR1 region subjected to alternative splicing with the list of rat specific sets of primers used for the analysis. The primer localization with the isoforms they enable to measure is given. (B) Quantification by qRT-PCR of different FMR1 isoforms ratio between PC12 (white bars) and PC12-1' (black bars) cells using the primer sets presented in (A). Data are means from qRT-PCR triplicates, normalized with GAPDH and using at least two independent RNA preparations. Values from PC12 were arbitrarily set to 1. *Student test P < 0.05. (C) Western blot with anti-FMRP (1C3) antibodies on PC12 and PC12-1' cell extracts separated on 2D PAGE. Spots described in the article are identified from a to f. pH ranges are indicated at the top of the 2D PAGE.

of FMRP. For instance, the isoforms lacking the 5' end of exon 15 produced by the alternative splicing at second and third acceptor sites both lack serine 499, the major known phosphorylation site of FMRP (36,37). This phosphorylation site was shown to modulate FMRP association to mRNAs in drosophila (37) and to affect translation in mammalian cells (36). Based on our observations, increased FMRP binding to FBS would result in a decrease in the synthesis of FMRP major isoforms (carrying a complete exon 15) together with an increase of minor

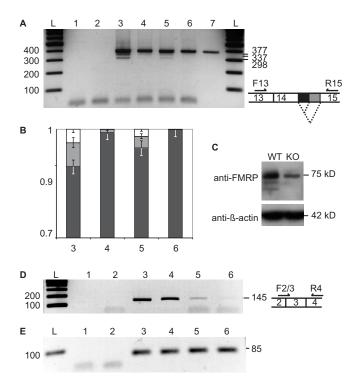


Figure 7. The absence of FMRP alters exon 15 FMR1 mRNA splicing in mouse cortical extracts. (A) RT-PCR analysis of splicing events in exon 15 using primers F13 and R15, hybridizing in exons 13 and 15, respectively. The ethidium bromide stained PCR products separated on a 1.8 % agarose gel is shown (negative image). 1, no Taq polymerase control; 2, no RT control with Wt total cortical RNA; 3, Wt total cortical RNA; 4, KO total cortical RNA; 5, Wt total RNA from cortical synaptoneurosomes; 6, KO total RNA from cortical synaptoneurosomes; 7, control pTL1 plasmid; L, DNA ladder. Expected size of each PCR product is indicated on the right side of the gel. (B) densitometric analysis of RT-PCR products shown in (A) and expressed as the ratio of exon 15 isoforms for lanes 3, 4, 5 and 6, with the same color code as for splice scheme in (A). Error bars are standard deviations with n = 3. (C) Western blot analysis of FMRP expression in the cortical extracts. The band seen with anti-FMRP antibody in FMR1 (KO) corresponds to cross-reactivity with FXRs. (D) RT-PCR using primers F2-3 and R4, hybridizing over exons 2, 3 and 4, respectively. Samples tested are the same as in (A). (E) RT-PCR using primers F-GAPDH and R-GAPDH hybridizing in GAPDH with the same samples as in (A).

isoforms (lacking serine 499) downregulating FMRP function in a negative autoregulatory loop.

In conclusion, while we could not show a translational effect of FMRP binding to its own FMR1 mRNA, our data support the implication of the FMRP/G-quartet interaction on the regulation of FMRP alternative splicing around exon 15. The fact that perturbations of the intracellular level of FMRP leads to modulation of exon 15 isoforms expression in a way susceptible to alter their RNA-binding properties suggests the existence of a possible autoregulatory loop. Our data suggest also that FMRP might be involved in splicing regulation of other genes containing G-quartet motifs in their protein coding sequence. This should be particularly prominent in neurons where FMRP is expressed at its highest level and even locally in dendrites where FMRP is present and splicing has been proposed to occur (38).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Barbara Bardoni, Bernard and Chantal Ehresmann, J. Tazzi, Nicolas Charlet and Cyril Bourgeois for helpful discussions, M. Beaulande and Eric Flatter for technical assistance, Enzo Lalli, Solange Pannetier, Edouard Bertrand and Tom Cooper for suggestions and material. This work was supported by National Institutes of Health (R01 HD40612-01), Agence Nationale de la Recheche (ANR-06-NEURO-015-01), Fondation Jérôme Lejeune to H.M., Fondation pour la Recherche Médicale to X.T., Association pour la Recherche sur le Cancer to M.C.D. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by GIE CERBM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Zalfa, F., Achsel, T. and Bagni, C. (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 16, 265–269.
- 2. Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Moine, H. (2003) The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol. Cell.*, **95**, 221–228.
- 3. Garber, K., Smith, K.T., Reines, D. and Warren, S.T. (2006) Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**, 270–275.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J.L., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Moine, H. (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. EMBO. J., 20, 4803–4813.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. and Darnell, R.B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, 107, 489–499.
- Chen, L., Yun, S.W., Seto, J., Liu, W. and Toth, M. (2003) The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience*, 120, 1005–1017.
- Darnell, J.C., Fraser, C.E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T.A., Eddy, S.R. and Darnell, R.B. (2005) Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev.*, 19, 903–918.
- Iacoangeli, A., Rozhdestvensky, T.S., Dolzhanskaya, N., Tournier, B., Schutt, J., Brosius, J., Denman, R.B., Khandjian, E.W., Kindler, S. and Tiedge, H. (2008) On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 734–739.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. and Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, 112, 317–327.
- 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. et al. (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. Cell, 107, 477–487.
- 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) RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron*, 37, 417–431.
- Lu,R., Wang,H., Liang,Z., Ku,L., O'Donnell,W.T., Li,W., Warren,S.T. and Feng,Y. (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule

- stability in brain neuron development. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **101**, 15201–15206.
- 13. Todd, P.K., Mack, K.J. and Malter, J.S. (2003) The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 100, 14374-14378.
- 14. Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K.S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., Tabolacci, E., Chiurazzi, P., Neri, G., Grant, S.G. et al. (2007) A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. Nat. Neurosci., 10, 578-587.
- 15. Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., Khandjian, E.W., Luche, S., Moine, H., Rabilloud, T., Mandel, J.L. and Bardoni, B. (2005) FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. Hum. Mol. Genet., 14, 835-844.
- 16. Westmark, C.J. and Malter, J.S. (2007) FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. PLoS Biol., 5, e52.
- 17. Khandjian, E.W., Huot, M.E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R. and Bardoni, B. (2004) Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 101, 13357-13362
- 18. Sittler, A., Devys, D., Weber, C. and Mandel, J.L. (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. Hum. Mol. Genet., 5, 95-102.
- 19. Coulter, L.R., Landree, M.A. and Cooper, T.A. (1997) Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. Mol. Cell. Biol., 17, 2143-2150.
- 20. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat. Biotechnol., 17, 1030-1032.
- 21. Mazroui, R., Huot, M.E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y. and Khandjian, E.W. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. Hum. Mol. Genet., 11, 3007-3017.
- 22. Verheggen, C., Lafontaine, D.L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J.M., Bordonne, R. and Bertrand, E. (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. EMBO. J., 21, 2736-2745.
- 23. Sagerstrom, C.G. and Sive, H.L. (1996) RNA blot analysis. In Krieg, P.A. (ed), A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis, Wiley-Liss, New York, pp. 83-103.
- 24. Witzmann, F.A., Arnold, R.J., Bai, F., Hrncirova, P., Kimpel, M.W., Mechref, Y.S., McBride, W.J., Novotny, M.V., Pedrick, N.M., Ringham, H.N. et al. (2005) A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. Proteomics, 5, 2177-2201.
- 25. Sung, Y.J., Conti, J., Currie, J.R., Brown, W.T. and Denman, R.B. (2000) RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA

- binding protein FMRP. Biochem. Biophys. Res. Commun., 275,
- 26. Ashley, C.T. Jr., Wilkinson, K.D., Reines, D. and Warren, S.T. (1993) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. Science, 262, 563-566.
- 27. Ceman, S., Brown, V. and Warren, S.T. (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. Mol. Cell. Biol., 19, 7925-7932.
- 28. Blencowe, B.J. (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. Trends Biochem. Sci., 25, 106-110.
- 29. Eberhart, D.E., Malter, H.E., Feng, Y. and Warren, S.T. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. Hum. Mol. Genet., 5, 1083-1091.
- 30. Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y. and Mandel, J.L. (1997) Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. Neurobiol. Dis., 4, 329-336.
- 31. Eichler, E.E., Richards, S., Gibbs, R.A. and Nelson, D.L. (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. Hum. Mol. Genet., 2, 1147-1153.
- 32. Verkerk, A.J., de Graaff, E., De Boulle, K., Eichler, E.E., Konecki, D.S., Reyniers, E., Manca, A., Poustka, A., Willems, P.J., Nelson, D.L. et al. (1993) Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. Hum. Mol. Genet., 2, 399-404.
- 33. Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science, 265, 615-621.
- 34. Weiler, I.J., Spangler, C.C., Klintsova, A.Y., Grossman, A.W., Kim, S.H., Bertaina-Anglade, V., Khaliq, H., de Vries, F.E., Lambers, F.A., Hatia, F. et al. (2004) Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 101, 17504-17509.
- 35. Pan, B., Xiong, Y., Shi, K., Deng, J. and Sundaralingam, M. (2003) Crystal structure of an RNA purine-rich tetraplex containing adenine tetrads: implications for specific binding in RNA tetraplexes. Structure, 11, 815-823.
- 36. Ceman, S., O'Donnell, W.T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J. and Warren, S.T. (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. Hum. Mol. Genet., 12, 3295-3305.
- 37. Siomi, M.C., Higashijima, K., Ishizuka, A. and Siomi, H. (2002) Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. Mol. Cell. Biol., 22, 8438-8447.
- 38. Glanzer, J., Miyashiro, K.Y., Sul, J.Y., Barrett, L., Belt, B., Haydon, P. and Eberwine, J. (2005) RNA splicing capability of live neuronal dendrites. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 102, 16859-16864.

1.3) Discussion et perspectives

Nous avons montré que les quartets de guanines présents dans l'ARNm Fmr1 ne semblent pas avoir un impact sur la synthèse de FMRP mais constitueraient un site cis modulateur du choix des sites d'épissage présents dans l'exon 15. Nous avons également proposé que FMRP pourrait, dans le cas de G-quartets présents dans une région codante, jouer le rôle de facteur *trans* de régulation de l'épissage. L'implication potentielle de FMRP dans le contrôle de l'épissage alternatif, notamment dans une boucle d'autorégulation de son propre ARNm Fmr1, constitue une nouvelle fonction de cette protéine. Nous pouvons proposer que FMRP se fixe sur le motif G-quartet et que les protéines SR, impliquées dans l'épissage alternatif, se fixent sur le FBS reconnu comme un ESE à proximité de FMRP. FMRP pourrait alors moduler le rôle des protéines SR dans leur choix du site accepteur d'épissage en 5' de l'exon 15. Cependant, n'ayant pas montré de rôle direct de l'interaction FMRP/G-quartet sur l'épissage du minigène, testé dans des fibroblastes Fmr1 +/+ et Fmr1 -/-, et de Fmr1, nous ne pouvons pas exclure que FMRP puisse intervenir dans la régulation traductionnelle de facteur impliqués dans l'épissage. Par ailleurs, nous pouvons nous demander quel pourrait être le rôle de cet épissage alternatif en 5' de l'exon dans la modulation des fonctions des différentes isoformes de FMRP. La région entre les premiers et seconds sites accepteurs d'épissage contient un site de phosphorylation (Ser500) vraisemblablement impliqué dans la régulation de la progression des polysomes sur les ARNm lors de l'élongation (Ceman et al., 2003). Lorsque cette Ser500 est phosphorylée, les ribosomes seraient bloqués en cours d'élongation sur les ARNm lors d'expériences de "ribosome run-off" suggérant que l'état de phosphorylation de FMRP pourrait moduler la progression des ribosomes lors de la traduction. Lorsque que FMRP est phosphorylée, les ribosomes sont bloqués, lorsqu'elle ne l'est pas, les ribosomes synthétisent les protéines. De plus, il a été montré au laboratoire, que la déphosphorylation de FMRP entraı̂ne une perte d'interaction FMRP/G-quartet (résultats non publiés). Par ailleurs, il a également été montré que l'épissage en 5' de l'exon 15 semble affecter les méthylations de la boîte RGG localisée en aval (Dolzhanskaya et al., 2008; Dolzhanskaya et al., 2006b). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les différentes isorformes de FMRP issues de l'épissage en 5' de l'exon 15 pourraient avoir différentes fonctions et donc de la régulation des ces évènements d'épissage module l'impact de FMRP sur la cellule.

De manière générale, les G-quartets localisés dans les régions codantes ou les régions UTR d'un ARNm, pourraient représenter des signaux *cis* reconnus par des facteurs *trans*

spécifiques impliqués dans différents mécanismes du métabolisme des ARNm comme la traduction (Arora et al., 2008; Horsburgh et al., 1996), la dégradation (Bashkirov et al., 1997; Christiansen et al., 1994) ou l'épissage. Des études visant à identifier des séquences activatrices d'épissage ont permis de montrer que des séquences riches en purines, évoquant celle du quartet de purines présente dans Fmr1, peuvent accomplir ce type de fonction. En effet, plusieurs études suggèrent l'implication de motifs G-quartets dans l'épissage alternatif. Une étude a notamment montré qu'une régulation de l'activité de transcription inverse de la télomérase humaine, hTERT (<u>h</u>uman <u>Te</u>lomerase <u>R</u>everse <u>T</u>ranscriptase) est due à une altération de son épissage alternatif par la modulation de la stabilité de motifs G-quartets localisés dans l'un de ses introns (Gomez et al., 2004). Par ailleurs, une récente étude bioinformatique a permis la création d'une banque de données contenant 1310 gènes humains et murins dont 1188 subissent des phénomènes d'épissage alternatif (G-quadraduplex Resource site: http://bioinformatics.ramapo.edu/GQRS/) (Kostadinov et al., 2006). Ces 1310 gènes seraient potentiellement capables de former environ 380 000 G-quartets dont environ 54 000 seraient localisés à proximité de sites d'épissage. Bien que ces chiffres paraissent disproportionnés par rapport à un rôle de régulateur de ces éléments, il serait intéressant de déterminer si certains des ARNm identifiés comme cibles de FMRP par les différentes études de microarrays sont également retrouvés dans la banque de donnée des 1188 gènes épissés et potentiellement capable de former un/des G-quartets. La recherche de certains ARNm régulé par FMRP montre que les ARNm APP, PSD-95 ou Fmr1 contenant un G-quartet sont présents dans cette banque de données alors que les ARNm SOD1, Gaba∂ ou FXR1/2, ne contenant pas de G-quartet n'y sont pas présents.

Afin d'identifier d'autres ARNm soumis à une régulation par FMRP au niveau de l'épissage alternatif, une étude a été entreprise au laboratoire au moyen de puces exon (*Affymetrix*) sur des extraits d'ARNm de cerveaux de souris *Fmr1*-/-.

2. Etude de l'influence de l'interaction FMRP/G-quartet sur l'expression *in vivo* d'un gène rapporteur

2.1) Objectifs de l'étude

Dans la précédente étude, nous avons montré un nouveau rôle potentiel de FMRP et de motifs G-quartets, localisés dans la région codante, dans l'épissage de l'ARNm Fmr1. Depuis l'identification de motifs G-quartets dans l'ARNm Fmrl, d'autres G-quartets ont été identifiés ou postulés dans plusieurs cibles validées ou potentielles de FMRP. Ces motifs ont été trouvés localisés dans les régions 5' et 3' UTR des ARNm où ils sont susceptibles de jouer un rôle de régulateur traductionnel : FGF2 (Bonnal et al., 2003), PP2Ac (Castets et al., 2005) et MAP1B (Lu et al., 2004; Zhang et al., 2001b) en région 5' UTR, et PSD-95 et APP (Todd et al., 2003; Westmark and Malter, 2007) en région 3' UTR. Afin de démontrer le rôle de l'interaction entre FMRP et un G-quartet sur l'expression génique, nous avons utilisé un système de gène rapporteur dans lequel nous avons inséré la séquence FBS, 100 nucléotides du gène Fmr1 contenant le premier motif G-quartet ciblé par FMRP identifié, en région 5' ou 3' UTR du gène rapporteur Renilla luciferase (Rluc). Nous avons également utilisé la région 5' UTR de PP2Ac, codant pour la sous-unité catalytique de la protéine PP2A et contenant plusieurs G-quartets caractérisés au laboratoire (Castets et al., 2005), ainsi que la région 3' UTR de PSD-95, supposée contenir un motif G-quartet, insérées respectivement dans les régions 5' et 3' UTR de Rluc. Ces vecteurs ont été transfectés de manière transitoire dans différentes lignées Fmr1^{+/+} ou Fmr1^{-/-}, avec ou sans un plasmide exprimant ou non FMRP. L'efficacité de la traduction a été évaluée par mesure de l'activité luciferase à partir des différentes constructions réalisées.

2.2) Etude de l'interaction FMRP/G-quartet sur un gène rapporteur

a) Système expérimental

Nous avons réalisé deux constructions avec la séquence FBS insérée dans la région 5' UTR du plasmide pRL-TK (cf matériel et méthode, § I-2-2.1-a), à 8 nucléotides en aval de la coiffe, et à 4 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction et appelées respectivement "*Rluc-FBScap*" et "*Rluc-FBSstart*" (figure 29a). Afin d'étudier une séquence

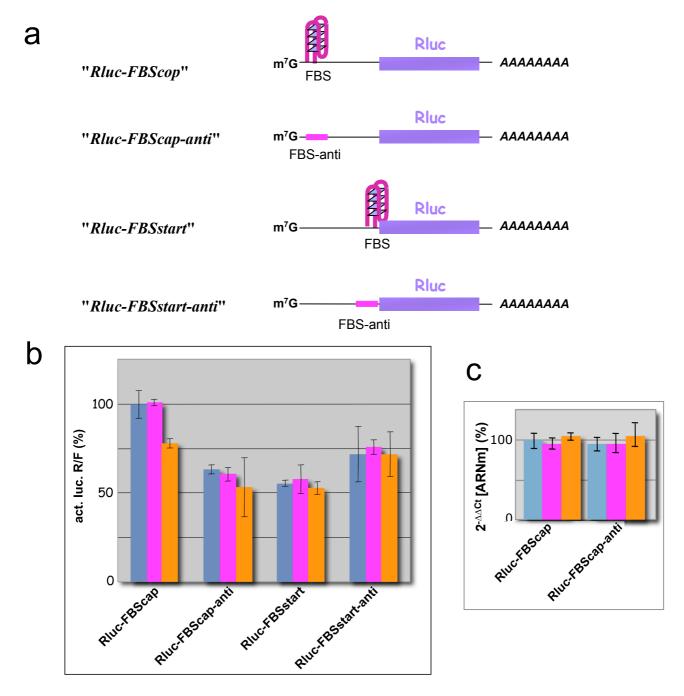


Figure 29. Effet de la séquence FBS en région 5' UTR sur l'expression du gène rapporteur *Rluc*

- a. Schéma des différentes constructions luciférase contenant la séquence FBS sens (Gq) ou antisens (anti) à huit nucléotides en aval de la coiffe "Rluc-FBScap" ou à quatre nucléotides en amont du codon start "Rluc-FBSstart".
- b. Activités luciferase des différentes constructions Rluc dans les extraits de fibroblastes murins *Fmr1*-/- immortalisés 24 h après la transfection. Les activités luciferase sont le rapport Rluc/Fluc dans les extraits de fibroblastes transfectés transitoirement avec les plasmides "*Rluc-FBScap*", "*Rluc-FBScap-anti*", "*Rluc-FBSstart*" et "*Rluc-FBSstart-anti*" et les plasmides pBS (bleu), FMRP iso7-I304N (rose) ou FMRP iso7 (orange). Les activités sont la moyenne de trois transfections indépendantes réalisées en triplicat. Une valeur arbitraire de 100 a été attribuée à la construction "*Rluc-FBScap*" + pBS control (les barres d'erreur représentent la déviation standard)
- c. Mesure du taux d'ARNm "*Rluc-FBScap*" et "*Rluc-FBScap-anti*" de trois transfections indépendantes réalisées en triplicat. Les valeurs 2^{-ΔΔCt} sont la comparaison des ARNm Rluc et Fluc. Une valeur arbitraire de 100 a été attribuée à la construction "*Rluc-FBScap*" + pBS control (les barres d'erreur représentent la déviation standard).

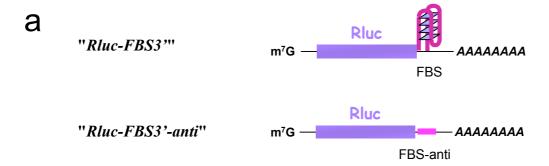
construction, "*Rluc-PP2Ac*", dans laquelle la région 5' UTR de pRL-TK a été remplacée par la région 5' UTR de l'ARNm *PP2Ac*. Pour chaque construction, une construction contrôle ("*Rluc-FBScap-anti*", "*Rluc-FBSstart-anti*" et "*Rluc-PP2Ac-anti*") a été produite par insertion de la séquence d'intérêt en orientation antisens et incapable de former un motif G-quartet (figure 29a). Nous avons également utilisé la construction "*Rluc-FBS3*", contenant le fragment FBS de *Fmr1* positionné en 3' UTR du gène *Rluc* à 30 nucléotides en aval du codon stop, et sa construction contrôle antisens correspondante, "*Rluc-FBS3'-anti*" (figure 30a).

L'expression de FMRP dans les fibroblastes $Fmr1^{-/-}$ a été obtenue par transfection du plasmide pTL-1-iso7, contenant le gène de l'isoforme majeure de FMRP, iso7, ou pTL-1-iso7-I304N exprimant FMRP iso7 avec la mutation ponctuelle I304N identifiée chez un patient avec un syndrome X fragile sévère (cf introduction, \S I-4-4.2-b) (Sittler et al., 1996). Les constructions avec le FBS en 3' UTR du gène rapporteur ont également été transfectées dans des cultures primaires de fibroblastes de souris $Fmr1^{-/-}$ et $Fmr1^{-/-}$.

b) Influence de FMRP et d'un G-quartet localisé dans la région 5' UTR d'un gène rapporteur

L'expression des différentes constructions du gène rapporteur *Renilla luciferase* a été analysée en comparant les rapports des activités luciferase Renilla et Firefly (Rluc/Fluc) dans les fibroblastes immortalisés *Fmr1*^{-/-} (Mazroui et al., 2002). Les résultats montrent une différence des rapports d'activité luciferase entre les constructions "*Rluc-FBScap*" par rapport à "*Rluc-FBScap-anti*" et "*Rluc-FBSstart*" par rapport à "*Rluc-FBSstart-anti*" (figure 29b). Ainsi, la construction "*Rluc-FBScap-anti*" présente une activité inférieure de 40 % à celle de la construction "*Rluc-FBScap*". En revanche, l'activité luciferase de la construction "*Rluc-FBSstart*" est plus faible de 20% par rapport à celle du contrôle "*Rluc-FBSstart-anti*". La séquence FBS en 5' UTR est donc susceptible d'affecter positivement ou négativement la traduction car la concentration des ARNm "*Rluc-FBScap*" et "*Rluc-FBScap-anti*", déterminée par PCR quantitative en temps réel, est identique (figure 29c). Lorsqu'elle est proche de la coiffe, la séquence FBS semblerait représenter un élément positif pour la traduction. En revanche, lorsqu'elle est proche du codon d'initiation, elle semble agir comme un élément négatif de la traduction.

Nous avons également analysé l'impact de la présence de FMRP en transfectant chaque construction *Renilla luciferase* avec un plasmide contrôle pBS ou pTL1-iso7,



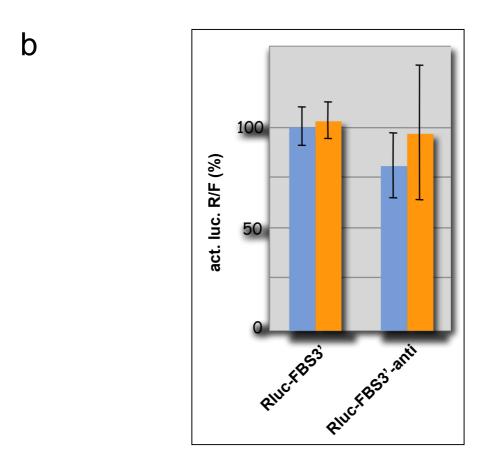


Figure 30. Effet de la séquence FBS localisée en région 3' UTR sur l'expression d'un gène rapporteur

a. Schéma des différentes constructions luciférase contenant la séquence FBS sens (Gq) ou antisens (anti) en région 3' UTR du gène *Renilla luciferase*.

b. Activités luciferase des différentes constructions *Rluc* dans les extraits de fibroblastes murins *Fmr1*-/- immortalisés 24 h après transfection. Les activités luciferase sont le rapport Rluc/Fluc dans les extraits de fibroblastes transfectés transitoirement avec les plasmides "*Rluc-FBS3*" et "*Rluc-FBS3*'-anti" et les plasmides pBS (bleu) ou pTL1-FMRP-iso7 (orange). Les activités sont la moyenne de trois transfections indépendantes réalisées en triplicat. Une valeur arbitraire de 100 a été attribuée à la construction "*Rluc-FBS3*" + pBS control (les barres d'erreur représentent la déviation standard)

exprimant la protéine FMRP iso7 sauvage, ou pTL1-iso7-I304N, exprimant la protéine FMRP iso7-I304N. Dans le cas des plasmides "*Rluc-FBScap-anti*", "*Rluc-FBSstart-anti*" et "*Rluc-FBSstart*", nous n'avons observé aucune différence d'expression en absence ou en présence de FMRP sauvage ou mutée. Par contre, en présence de FMRP sauvage, l'expression de la construction "*Rluc-FBScap*" est diminuée d'environ 25 % par rapport à celle en absence ou en présence de FMRP mutée (figure 29b). Ces résultats suggèrent que FMRP a une d'influence sur l'expression d'un gène rapporteur dont la région 5' UTR forme une structure G-quartet à proximité de la coiffe. Lorsque le G-quartet est localisé à plus de 50 nucléotides de la coiffe, l'interaction FMRP/G-quartet ne semble plus avoir d'effet. Ainsi, FMRP semble neutraliser l'effet positif du motif G-quartet proche de la coiffe sur la traduction. L'interaction FMRP/G-quartet, lorsqu'elle a lieu dans les 50 nucléotides de la coiffe, pourrait affecter la formation du complexe de pré-initiation sur la coiffe en gênant le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction.

Afin de déterminer le rôle d'un motif G-quartet dans un contexte 5' UTR "naturel", nous avons testé la construction "Rluc-PP2Ac" comportant la région 5' UTR de l'ARNm PP2Ac entière. Cette région contient plusieurs motifs G-quartets et pourrait être impliquée dans le contrôle traductionnel de l'ARNm PP2Ac (Castets et al., 2005). La construction contrôle "Rluc-PP2Ac-anti" contient la même insertion en orientation antisens. Cependant, les activités luciferase mesurées à partir de ces deux constructions étant trop faibles, nous n'avons pas pu conclure quant à l'impact des G-quartets du gène PP2Ac sur la régulation de la traduction. Dans ces constructions, la richesse en structures secondaires de la région 5' UTR de PP2Ac, contenant plusieurs G-quartets (Castets et al., 2005), ainsi qu'un contexte particulièrement riche en GC pourrait rendre difficile la traduction. Par ailleurs, la suppression d'une séquence intronique, présente dans le plasmide pRL-TK mais éliminée dans les constructions "Rluc-PP2Ac", dont il a été montré qu'elle favorise l'expression d'un gène localisé en aval (Buchman and Berg, 1988), pourrait aussi contribuer au très faible taux d'expression.

c) Influence de FMRP et d'un G-quartet localisé dans la région 3' UTR d'un gène rapporteur

Nous avons transfecté les constructions "*Rluc-FBS3*" et "*Rluc-FBS3*'-anti" dans des cultures primaires de fibroblastes murins *Fmr1*-/-. La comparaison de l'activité luciferase des

différentes constructions révèle que la construction "*Rluc-FBS3'-anti*" présente une activité luciferase plus élevée que celle de la construction "*Rluc-FBS3'*" (figure 30b). Ces résultats indiquent un effet négatif du motif G-quartet positionné en région 3' UTR sur l'expression du gène rapporteur.

Nous avons ensuite comparé l'expression des constructions en culture primaire de fibroblastes $Fmr1^{-/-}$ et $Fmr1^{+/+}$ afin de tester l'influence de FMRP sur la traduction de ces gènes rapporteurs. L'expression des constructions est identique en absence ou en présence de FMRP. L'insertion du FBS dans la région 3' UTR d'un gène rapporteur ne nous a pas permis de conclure quant à l'effet de l'interaction G-quartet/FMRP sur la régulation traductionnelle. Nous avons alors entrepris d'utiliser, dans ce système de gène rapporteur, un motif G-quartet d'un gène cible de FMRP situé dans son contexte natif en 3' UTR : *PSD-95*.

2.3) Etude de l'ARNm *PSD-95*, cible neuronale de FMRP

a) L'ARNm PSD-95 contient un quartet de guanines

L'expression élevée de FMRP dans les cellules neuronales, en comparaison aux autres tissus, l'altération quantitative et qualitative des épines dendritiques dans les neurones de patients et d'animaux modèles Fmr1-/- (souris, drosophile), suggèrent que FMRP a un rôle important dans le développement et/ou le fonctionnement des neurones via la régulation des ARNm. Plusieurs études ont montré, dans des cultures de neurones et des extraits de cortex ou d'hippocampe Fmr1^{-/-}, l'altération de l'expression de PSD-95, protéine de structure de la synapse importante pour le fonctionnement neuronal (Muddashetty et al., 2007; Todd et al., 2003; Zalfa et al., 2007). Suite à la stimulation des récepteurs au glutamate, l'expression de PSD-95 augmente dans les neurones sauvages alors que dans les neurones Fmr1^{-/-} le niveau basal d'expression de PSD-95 reste inchangé (Todd et al., 2003). Ces données suggèrent un rôle de FMRP dans la régulation traductionnelle de PSD-95. Par ailleurs, bien qu'une récente étude propose l'implication de FMRP dans la stabilisation de l'ARNm PSD-95 (Zalfa et al., 2007), le mécanisme exact de la régulation de sa traduction par FMRP n'est pas encore bien établi. L'ARNm PSD-95 a été identifié comme cible potentielle de FMRP sur la base d'une analyse bioinformatique recherchant des motifs G-quartets (Todd et al., 2003). En effet, la région 3' UTR de PSD-95 contient une région riche en guanines dont la comparaison avec la séquence du FBS mais surtout avec la séquence consensus du motif G-quartet par alignement de séquence suggèrerait fortement la formation d'un G-quartet à son extrémité 3' (figure 31a) a

b

Homo sapiens : ttttttggggaaaagggagggatgggtctaggggaaat
Mus musculus : ttttttgggaaaagggaggatgggtctaggggagtgggaat
Ratus norvegicus :tttttttgggaaaagggaggatgggtctagggagtgggaat

3880

gdaggaggggggggggaaagggtcaggggtcgggttgcgggtccgggagccagggaag-act gtgggagggggtggggggcaaagggtcaggggttgggtgtccgggagccaggagggaca atgggagggggtggggggcaaggggtcaggggttgggtgtccgggagccaggggagaca

Figure 31. Alignement des séquences riches en purines dans la région 3' UTR des gènes *PSD-95* de vertébrés potentiellement capables de former un motif en quartet de guanines

- a. Comparaison par alignement des séquences de l'ARNm de *PSD-95* de *Homo sapiens, Ratus norvegicus* et *Mus musculus* avec la séquence FBS de *Fmr1* et la séquence consensus des motifs G-quartet (d'après Todd *et al.*, 2003).
- b. Alignement de la séquence riche en guanines des ARNm de *PSD-95* de *Homo sapiens* (nt 3801 à 3902; NM_001365), *Mus musculus* (nt 2883 à 2988; NM_001109752) et *Ratus norvegicus* (nt 2889 à 2994; NM_019621).

La flèche indique la position de l'arrêt de la reverse transcriptase à l'extrémité 3' du motif G-quartet de l'ARNm *PSD-95* de *Homo sapiens*.

Les nucléotides encadrés correspondent à une délétion de 36 nucléotides réalisée pour abolir la formation de G-quartets dans l'ARNm PSD-95 ($PSD837-\Delta Gq$) (cf texte).

(Todd et al., 2003). Cependant l'étude de Zalfa et al a rejeté cette hypothèse sur la base que l'ARN *PSD-95* ne montrait pas de sensibilité aux cations monovalents (Zalfa et al., 2007). Avant la parution de ces travaux, nous étions arrivés à une conclusion opposée à savoir que *PSD-95* contient bien un tel motif dans sa région 3' UTR.

Les structures G-quartets présentent une sensibilité particulière à la nature du cation présent dans le milieu car elles nécessitent la présence de cation monovalent pour leur stabilité. Du fait de la taille et de l'énergie de solvatation de ces ions, elles sont plus stables en présence des ions K⁺ qu'en présence des ions Na⁺ ou Li⁺. Il est possible de visualiser l'existence d'un G-quartet dans un ARN grâce à la technique de rétrotranscription de l'ARN en ADNc correspondant par la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) à partir d'un oligonucléotide radio-marqué. En présence de K⁺, les G-quartets, très stables, bloquent la progression de la transcriptase inverse à l'extrémité 3' de la structure entraînant la synthèse d'un produit tronqué. Au contraire, en présence de Li⁺ ou Na⁺, les Gquartets présentent généralement une stabilité diminuée ce qui permet la synthèse de l'ADNc entier plus efficacement. La visualisation des produits de transcription inverse a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide urée 8 M (figure 32). La présence de plusieurs bandes de forte intensité, correspondant à des arrêts de l'enzyme au niveau des positions 3880 et 3875, dans la piste correspondant à la réaction de transcription réalisée en présence de K⁺, mais non dans les pistes en présence de Na⁺ et Li⁺, révèle la présence d'une structure très stable dépendante du cation (figure 32 ; piste K). Ces résultats suggèrent la présence d'un motif G-quartet dans l'ARN PSD-95. Les arrêts coïncident avec les dernières guanines d'un stretch de 53 guanines suggérant l'implication de la région située entre les nucléotides 3808 à 3880 de l'ARNm PSD-95 humain (figure 31b). Les mêmes résultats ont été obtenus avec un fragment contenant les 219 derniers nucléotides de la 3' UTR de PSD-95.

b) FMRP interagit spécifiquement avec l'ARNm PSD-95 via une structure en quartet de purines

Après avoir identifié la présence d'un motif G-quartet dans la région 3' UTR de *PSD-95*, il était important de déterminer si FMRP possède une réelle spécificité d'interaction pour cet ARN et *via* cette structure. Dans cet objectif, Murugan Subramanian, de notre équipe, a comparé l'efficacité d'interaction de FMRP sur la 3' UTR de l'ARNm *PSD-95* en fonction de la nature du cation présent dans le milieu. Dans un premier temps, il a montré que

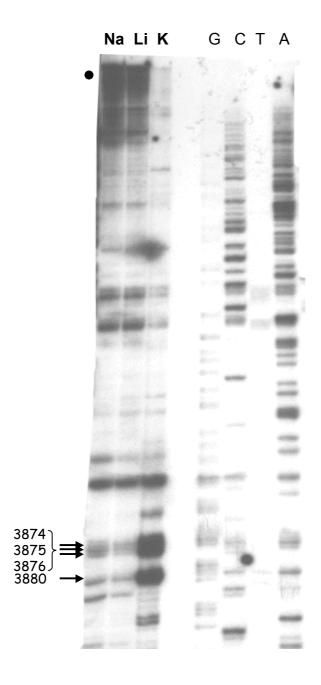


Figure 32. Indication de la présence d'une structure en quartet de guanines dans l'ARNm *PSD-95* humain

Test d'élongation dépendant du cation par la transcriptase inverse sur la région 3' UTR de l'ARNm *PSD-95* humain. L'ARN a été rétrotranscrit en présence de 40 mM de NaCl, LiCl ou KCl (pistes Na, Li et K). Les flèches indiquent les quatre fortes pauses de la transcriptase inverse en présence de K⁺ avec leur position dans la séquence de l'ARNm *PSD-95*. Les produits d'extension entiers sont indiqués par un cercle plein. En parallèle, le séquençage de *PSD-95* a été réalisé afin d'identifier la position des arrêts de la transcriptase inverse (pistes G,C, A et T).

l'interaction entre FMRP et le fragment PSD219, une séquence de 219 nucléotides correspondant à l'extrémité 3' de la région 3' UTR de PSD-95 et contenant le motif G-quartet proposé, entraîne un retard de migration sur gel de l'ARN PSD219 (figure 33a). De plus, cet effet retard est dépendant de la nature du cation présent dans le milieu. En effet, le retard de migration est déclenché à une concentration en FMRP plus faible en présence de K⁺, qui stabilise les G-quartets, qu'en présence de Li⁺ (0,6 pmol K⁺ vs 250 pmol Li⁺) (figure 33a; pistes KCl-50, LiCl-250). La spécificité d'interaction entre FMRP et le fragment PSD219 a été vérifiée par des expériences de compétition entre le fragment N19 de Fmr1, contenant le site FBS (Schaeffer et al., 2001), et le fragment PSD219. Une compétition a également été réalisée avec un fragment, $PSD219-\Delta Gq$, dans lequel la séquence riche en G suspectée responsable de la formation du G-quartet a été délétée de 30 nucléotides (figure 33b). Le K_d de PSD219 a été estimé à environ 5 nM selon la concentration en PSD219 froid nécessaire pour déplacer 50% de l'ARN N19 radio-marqué lié à FMRP. Par ailleurs, la quantité de PSD219 froid nécessaire pour déplacer l'interaction FMRP/N19 est inférieure à la quantité en $PSD219-\Delta Gq$ nécessaire. En absence du G-quartet, le fragment $PSD219-\Delta Gq$ montre une efficacité de compétition inférieure à celle du fragment sauvage PSD219 suggérant que le Gquartet est bien responsable de l'interaction entre FMRP et l'ARN PSD-95.

c) Etude de l'impact de FMRP et de la région 3' UTR de PSD-95 sur l'expression in vivo d'un gène rapporteur

Système expérimental

Afin de montrer un rôle sur la traduction de l'interaction entre FMRP et le G-quartet formé par la région 3' UTR de l'ARNm PSD-95, nous avons utilisé le plasmide pRL-TK (cf matériel et méthode, § I-2-2.1-a). Nous avons réalisé deux constructions comportant en 3' du gène $Renilla\ luciferase$, soit la région 3' UTR entière de PSD-95, soit le fragment 3' terminal de 219 nucléotides comportant le motif G-quartet et appelées respectivement "Rluc-PSD837" et "Rluc-PSD219" (figure 34a). Comme contrôle négatif, nous avons utilisé les constructions " $Rluc-PSD837-\Delta Gq$ ", dans laquelle 30 nucléotides formant le motif de G-quartet ont été délétés, et "Rluc-PSD219-anti", dans laquelle la séquence de 219 nucléotides a été insérée en orientation antisens. Tous ces fragments de l'ARNm PSD-95 ont été insérés à 2 nucléotides en aval du codon stop de Rluc.

L'effet sur l'expression génique de la présence de la séquence contenant le G-quartet de *PSD-95* dans la région 3' UTR de *Rluc* a été testé dans des cultures primaires de

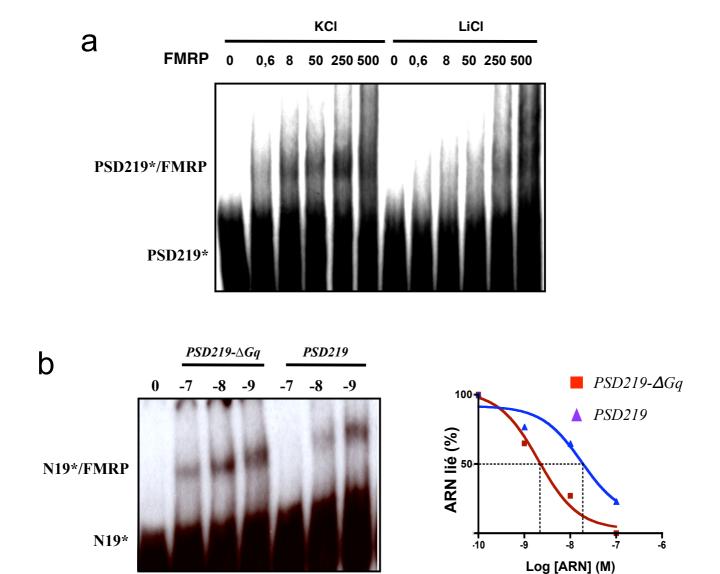


Figure 33. Interaction entre FMRP et l'ARNm *PSD219* par expérience de retard sur gel a. Comparaison de l'affinité de FMRP pour le fragment d'ARN radiomarqué *PSD219* en fonction du cation K⁺ ou Li⁺ (150 mM) en présence d'une quantité croissante en FMRP (0,6 à 500 pmol).

b. Effet de la délétion du G-quartet sur l'interaction avec FMRP. L'ARN N19 radio-marqué (N19*) a été incubé avec FMRP (100 pmol) en absence (0) ou en présence de concentration croissante en ARN compétiteur PSD219 sauvage (PSD219) ou mutant ($PSD219-\Delta Gq$) non marqué. Le pourcentage d'ARN N19* radio-marqué lié à FMRP a été déterminé en fonction de la concentration en ARN compétiteur PSD219 (triangle bleu) ou mutant $PSD219-\Delta Gq$ (carré rouge) non marqué (M).

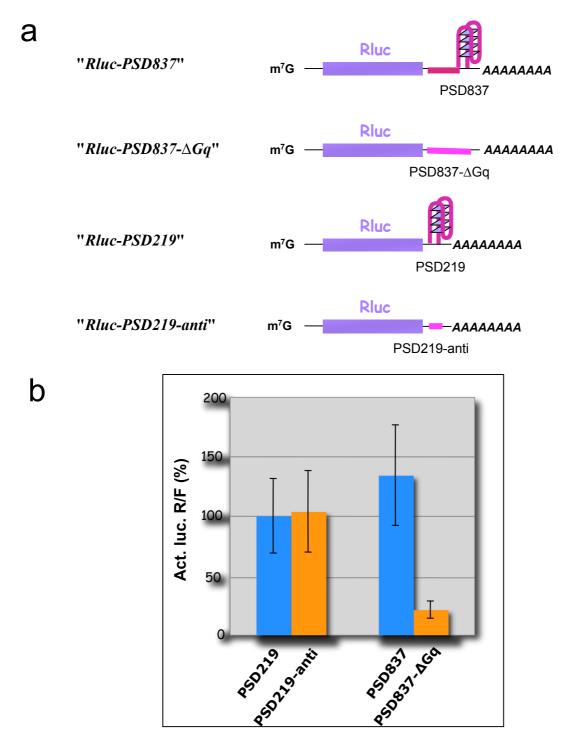


Figure 34. Effet de la région 3' non traduite de *PSD-95* ou de son G-quartet sur l'expression d'un gène rapporteur

a. Schéma des différentes constructions luciférase contenant la séquence sauvage (en bleu) ou mutante (ΔGq ou antisens, en orange) de la région 3' non traduite entière "*Rluc-PSD837*" ou un fragment de 219 nucléotides de la région 3' UTR de l'ARNm *PSD-95* "*Rluc-PSD219*".

b. Activités luciferase des différentes constructions Rluc dans les extraits de neurones murins $Fmr1^{+/+}$ 24 h après la transfection. Les activités luciferase sont le rapport Rluc/Fluc dans les extraits de fibroblastes transfectés transitoirement avec les plasmides "Rluc-PSD837" et "Rluc-PSD219" (bleu), " $Rluc-PSD837-\Delta Gq$ " et "Rluc-PSD219-anti" (orange). Les activités sont la moyenne de trois transfections indépendantes réalisées en triplicat. Une valeur arbitraire de 100 a été attribuée à la construction "Rluc-PSD219" (les barres d'erreur représentent la déviation standard).

fibroblastes ou de neurones corticaux ou hippocampaux d'embryons (E14) de souris $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$. L'efficacité de l'expression des différentes constructions a été évaluée dans ces cellules, transfectées de manière transitoire, par mesure de l'activité luciferase. Les cellules ont été lysées et les activités luciferase ont été mesurées après 12 h, 24 h ou 36 h suivant la transfection. Afin de normaliser les valeurs de l'activité luciferase Renilla en fonction de l'efficacité de transfection et du nombre de cellules, le plasmide normalisateur pFlash, codant pour le gène *Firefly* luciferase en aval du promoteur SV40, a été cotransfecté avec chaque construction rapporteur.

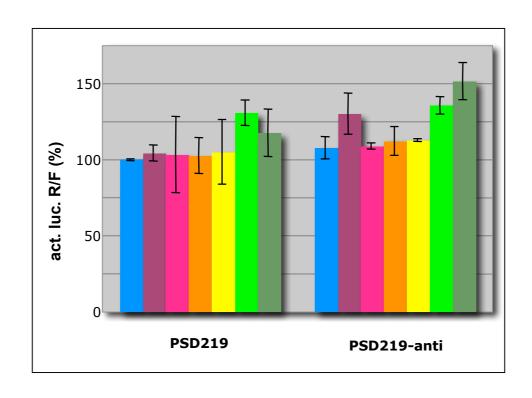
Influence du motif G-quartet sur l'expression génique

Dans un premier temps, l'efficacité d'expression des différentes constructions a été comparée dans les fibroblastes et neurones $Fmr1^{+/+}$. L'activité luciferase issue de la transfection de la construction "Rluc-PSD837- ΔGq " est considérablement plus faible que celle de la construction "Rluc-PSD837" (figure 34b). La région 3' UTR de PSD-95 semble donc moduler positivement la traduction en fonction de la présence d'un G-quartet. Cet effet serait dépendant de la présence d'une autre séquence située en amont de la position 618 car l'effet est perdu dans le contexte du fragment de 219 nucléotides des constructions "Rluc-PSD219" et "Rluc-PSD219-anti". Cependant, il conviendrait de tester l'effet de la même délétion de 30 nucléotides, dans le contexte du fragment de 219 nucléotides.

Influence de FMRP sur l'expression génique

Dans les fibroblastes $Fmr1^{-/-}$, le gène rapporteur "Rluc-PSD219" a été cotransfecté avec les plasmides codant pour les isoformes nucléaires (iso 10 et 12) ou cytoplasmiques (iso 1 et 7) sauvage (WT) ou mutante (I304N) de FMRP. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les activités luciferase quelque soit l'isoforme de FMRP cotansfecté. Ces résultats indiquent l'absence d'effet significatif des différentes isoformes de FMRP sur l'expression de la construction "Rluc-PSD219" dans les constructions utilisées (figure 35).

Nous avons également testé l'expression de "*Rluc-PSD837*" dans les cultures primaires de fibroblastes $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$ (figure 36). Suivant la transfection, les fibroblastes ont été mis en culture 12 h, 24 h ou 36 h afin d'évaluer l'impact de FMRP sur la régulation de la traduction en fonction du temps. Les activités luciferase mesurées en absence ou en présence de FMRP sont apparemment identiques quelque soit le temps de culture des cellules après leur transfection (figure 36a). Dans ces conditions, FMRP et la région 3' UTR de *PSD-95* ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression du gène. Il a été montré que FMRP



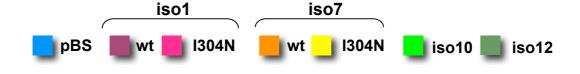
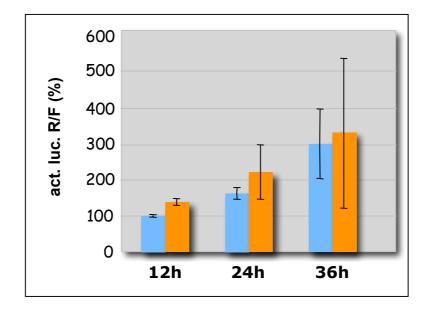


Figure 35. Effet de différentes isoformes de FMRP sur l'expression du gène rapporteur *Rluc-PSD219*

Les activités luciferase sont le rapport Rluc/Fluc dans les extraits de cultures primaires de fibroblastes *Fmr1*-/- transfectés transitoirement avec les constructions Rluc "*Rluc-PSD219*" et "*Rluc-PSD219-anti*" cotransfectées avec les plasmides pTL-1 codant pour différentes isoformes cytoplasmiques (iso 1 et 7) sauvage (wt) ou mutant (I304N) et les isoformes nucléaires (iso 10 et 12) de FMRP. Les activités sont la moyenne de deux transfections indépendantes réalisées en triplicat. Une valeur arbitraire de 100 a été attribuée à la construction "*Rluc-PSD219*" + pBS (les barres d'erreur représentent la déviation standard). Le code couleur utilisé pour les différentes isoformes de FMRP est indiqué en dessous du graphique.







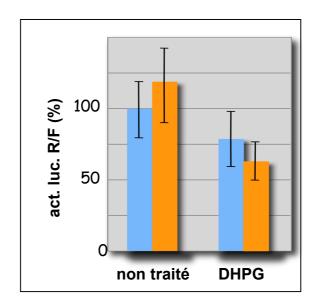


Figure 36. Effet de l'absence de FMRP sur l'expression d'un gène rapporteur comportant la région 3' UTR de *PSD95-837*

Les activités luciferase sont le rapport Rluc/Fluc mesuré dans les extraits de cultures primaires de fibroblastes (a) ou de neurones (b) *Fmr1*^{+/+} (bleu) ou *Fmr1*^{-/-} (orange) transfectés transitoirement avec la construction "Rluc-PSD837".

- a. Les fibroblastes ont été lysés 12 h, 24 h ou 36 h après la transfection.
- b. Les neurones ont été stimulés 1 h suivant la transfection et pendant 5 h par ajout de DHPG (100 µM) toutes les heures avant lyse des cellules.

Les activités représentent des résultats de la moyenne de triplicat d'une transfection. Les valeurs arbitraires de 100 ont été attribuées à la construction "*Rluc-PSD837*" après 12 h de transfection dans les fibroblastes *Fmr1*^{+/+} (a) et dans les neurones *Fmr1*^{+/+} non traités (b) (les barres d'erreur représentent la déviation standard).

a un effet sur l'expression de PSD-95 dans des conditions de stimulation neuronale. Dans l'hypothèse ou l'action de FMRP nécessite des cofacteurs neuronaux, nous avons alors entrepris l'étude de l'expression de "*Rluc-PSD837*" dans les cultures primaires de neurones corticaux. Ces cellules ont été transfectées puis stimulées ou non par le DHPG (100 μM), agoniste des récepteurs au glutamate dont il a été montré qu'il a un impact sur la traduction dépendante de FMRP (Todd et al., 2003). Une heure après la transfection, les cellules ont été traitées par ajout de DHPG toutes les heures pendant 5 heures. Dans ces deux conditions, neurones activés ou non, les activités luciferase mesurées sont identiques en absence ou en présence de FMRP (figure 36b). Par ailleurs, le traitement au DHPG n'a pas induit d'augmentation de l'activité luciferase reflétant une augmentation d'expression du gène rapporteur comme décrit précédemment (Todd et al., 2003).

2.4) Discussion et perspectives

Malgré l'identification d'un nombre toujours croissant de motifs G-quartets dans les ARN, leur rôle exact est toujours méconnu à l'heure actuelle. D'après nos résultats, et ceux d'autres laboratoires, il semble que leur impact sur le métabolisme de l'ARNm soit différent selon qu'ils sont localisés en région 5' ou 3' UTR et en région codante. De manière générale, ces motifs pourraient être impliqués dans la régulation traductionnelle des ARNm via le recrutement de facteurs protéiques tels que FMRP. Le motif G-quartet dans la séquence codante FBS de Fmr1 représenterait un système de contrôle de l'épissage que la liaison avec FMRP pourrait moduler (Didiot et al., 2008). Le motif IRES formé par la région promotrice du gène FGF-2 contient un G-quartet qui favorise l'activité IRES (Bonnal et al., 2003). Des G-quartets présents dans la région 5' UTR d'un gène pourrait inhiber sa traduction (Castets et al., 2005). Grâce au système de gène rapporteur luciferase utilisé dans cette étude (§ I-2-2.2b), nous avons montré que la localisation d'un G-quartet en 5' UTR au voisinage de la coiffe d'un gène, influence positivement la traduction et cet effet est réprimé par la présence FMRP. Une récente étude a montré que la présence d'un quartet de guanines dans la région 5' UTR d'un ARNm réprime la traduction sans affecter le taux d'ARNm dans des cellules eucaryotes (Arora et al., 2008). En revanche, son rôle en 3' UTR semble plus complexe car dépendant de la présence d'autres éléments régulateurs.

PSD-95 est une protéine impliquée dans la structure des extrémités post-synaptiques des neurones. La régulation de l'ARNm *PSD-95* par FMRP jouerait un rôle important dans la morphologie des synapses comme l'indiquent les altérations des épines dendritiques

observées chez les patients atteints par le syndrome de l'X fragile et les souris Fmr1^{-/-}. Nous avons analysé la région 3' UTR de l'ARNm PSD-95, cible proposée de FMRP, et avons montré qu'elle forme un G-quartet à son extrémité 3'. Nous avons montré que l'interaction entre FMRP et cet ARN dépend de la présence du G-quartet. Récemment, une étude réalisée sur l'implication de FMRP dans la régulation de la synthèse de PSD-95 a également montré l'interaction directe entre FMRP et l'extrémité 3' de la région 3' UTR de PSD-95 (Zalfa et al., 2007). Cependant, les auteurs ayant observé que la présence de Li⁺ n'interférait pas avec cette association en ont conclu que cette interaction est indépendante du cation présent dans le milieu et que FMRP reconnaît une séquence riche en guanines mais qui ne forme pas un Gquartet. Nous pensons que l'interprétation d'une absence de G-quartet dans PSD-95 par ces auteurs est erronée car ils n'ont pas effectué d'étape de dénaturation-renaturation de l'ARNm permettant le remplacement des ions stabilisant les structures G-quartets par les ions présents dans le milieu réactionnel. En culture primaire de fibroblastes et de neurones à l'état basal, nous avons montré que la région 3' UTR entière de PSD-95 joue un rôle positif dans l'expression d'un gène rapporteur pouvant suggérer un rôle positif du motif G-quartet dans la régulation traductionnelle de l'ARNm PSD-95. Cependant, nos résultats avec l'ARN PSD95-219 suggèrent que la seule présence d'un G-quartet en aval d'un gène ne semble pas suffisante en soit pour induire la régulation de la traduction. Ce motif doit agir de concert avec d'autres éléments régulateurs présents dans les régions 3' UTR. En présence de FMRP, nous n'avons observé aucune différence d'activité luciferase entre les constructions sauvages et mutantes. FMRP ne semble pas intervenir dans la régulation de l'expression génique dans des fibroblastes et des neurones à l'état basal. Il reste maintenant à déterminer si le G-quartet a un effet au niveau de la stabilité ou du transport de l'ARNm PSD-95. La région 3' UTR de PSD-95, longue de 837 nucléotides, doit contenir d'autres séquences spécifiques cis essentielles à la fonction du G-quartet contrôlant ou complémentant son utilisation grâce au recrutement de facteurs protéiques. Étant donné le recrutement de FMRP dans les granules neuronaux de transport des ARNm, elle pourrait participer à la régulation de ce mécanisme pour ses ARNm cibles, dont PSD-95 lorsque la synthèse protéique est nécessaire pour la plasticité synaptique. En effet, cet ARN est localisé dans les dendrites ((Zalfa et al., 2007); Subramanian non publié). L'étude sur l'implication du G-quartet et de FMRP sur le transport de l'ARNm PSD-95 le long des dendrites été initiée au laboratoire par Murugan Subramanian en culture primaire de neurones Fmr1+++ ou Fmr1-+- par FISH et grâce à un système de visualisation de la localisation des ARNm in vivo basé sur l'utilisation de la GFP (Daigle and Ellenberg, 2007). L'ARN d'intérêt est inséré dans l'ARNm de la protéine RFP qui comporte

un motif tige-boucle, "box B". Le motif "box B" est reconnu par le peptide Lambda N fusionné à la GFP ce qui permet de visualiser l'ARNm d'intérêt *in vivo* grâce à la fluorescence de la GFP. La visualisation de la protéine RFP constitue un contrôle permettant de visualiser la traduction de l'ARNm d'intérêt.

Les résultats obtenus grâce aux analyses réalisées sur l'effet de ligands sur des Gquartets formés par l'ADN (De Cian and Mergny, 2007; Mergny and Helene, 1998; Sun et al., 1997) suggèrent que les G-quartets formés par l'ARN puissent également constituer des cibles thérapeutiques. Il est, ainsi, tentant de spéculer que le ciblage des motifs G-quartets reconnus par FMRP pourrait être un moyen de contrôler les ARNm dérégulés dans le syndrome de l'X fragile. Les thérapies par la réactivation du gène Fmr1 et la régulation de l'activité des récepteurs au glutamate ont fait l'objet de plusieurs études afin de rétablir un phénotype normal chez les patients atteints par le syndrome de l'X fragile. Cependant, les composés utilisés pour réactiver la transcription de Fmr1 sont toxiques pour les cellules et, on peut se demander si les récepteurs au glutamate représentent des cibles spécifiques car leur régulation pourrait moduler l'activité de l'ensemble des voies de signalisation en aval dont celles qui ne seraient pas touchées par l'absence de FMRP. La transfection transitoire, dans des cellules en culture, du système de gène rapporteur luciferase, contenant les motifs ARN reconnus par FMRP, pourrait constituer une méthode d'étude de l'impact de ligands de faible poids moléculaire de ces motifs sur la traduction. Cette stratégie pourrait permettre d'identifier des ligands ayant le même effet que FMRP sur l'expression de ses ARN cibles afin d'identifier des voies pour de futurs traitements, inexistants à l'heure actuelle, pour les patients atteints par le syndrome de l'X fragile. Les ligands identifiés pourraient être utilisés dans des cellules neuronales Fmr1^{-/-}, le rétablissement d'une morphologie normale des épines dendritiques constituant un bon moyen d'évaluer ex vivo l'effet du ligand.

Le développement de méthodes de détection des structures ARN (G-quartet), tel que des marqueurs fluorescents, précédemment utilisés afin de localiser des motifs G-quartets dans les régions télomériques de l'ADN, pourrait contribuer à la localisation d'ARNm et permettre d'analyser les mouvements de FMRP par rapport à ses ARNm cibles et ainsi de déterminer son rôle (transport, stabilisation) vis à vis de ses cibles en fonction du temps et des conditions cellulaires.

II. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE FMRP DANS LE MÉTABOLISME DES ARNM NON TRADUITS

1. Objectifs de l'étude

L'identification de liens biochimique et génétique entre FMRP et les protéines du complexe RISC suggérait que FMRP joue un rôle dans le mécanisme d'ARN interférence, mais ce rôle n'avait pas clairement été établi. Nous avons entrepris de confirmer ou infirmer l'implication de FMRP dans la machinerie RISC en analysant un certain nombre de paramètres. De récentes études ont montré l'accumulation de RISC et des ARNm soumis à l'ARN interférence dans des granules cytoplasmiques, les processing bodies ou P-Bodies (cf introduction, § IV-4-4.4). Ces granules cytoplasmiques sont impliqués dans la dégradation et le stockage des ARNm dont la traduction est réprimée. Nous avons étudié les liens physiques et fonctionnels entre FMRP et le complexe RISC et, en particulier, nous avons mesuré l'impact de l'absence de FMRP sur la voie des micro-ARN. En condition de stress, contrairement à la machinerie RISC, FMRP s'accumule dans les granules de stress. Nous avons évalué le recrutement de FMRP dans ces granules par rapport à d'autres protéines de liaison à l'ARN, elles aussi recrutées dans les granules de stress, et étudié l'impact de FMRP dans leur formation.

2. Publication 3

En comparant la localisation cellulaire de FMRP par rapport à celle des P-Bodies, où les composés du RISC s'accumulent, nous avons observé que FMRP est essentiellement exclue de ces foci en désaccord avec les propositions d'une participation de FMRP à la fonction de RISC. Puis, nous avons montré que la localisation d'eIF2C2 (protéine "core" du RISC et homologue de la protéine AGO2 chez l'homme) dans les polysomes est indépendante de celle de FMRP. Enfin, nous avons mesuré l'influence de FMRP sur l'activité RISC avec un système de gène rapporteur transfecté dans des fibroblastes d'embryons de souris. Nous avons montré, d'une part, que l'absence de FMRP n'affecte pas l'efficacité normale du complexe RISC et, d'autre part, que la présence d'un G-quartet (sensé stimulé le recrutement de FMRP sur ces ARNm cibles), en aval des sites microARN dans le gène rapporteur,

n'augmente pas l'efficacité du RISC. L'ensemble de nos résultats suggère que FMRP et eIF2C2 appartiennent à des complexes ribonucléoprotéiques indépendants et que FMRP est une protéine inutile pour l'activité du RISC.

En condition de stress, FMRP est recrutée dans les granules de stress, impliqués dans le stockage des ARNm non traduits (Mazroui et al., 2002). Dans cette étude, nous avons montré un défaut de formation des granules de stress dans des cultures primaires de fibroblastes d'embryons de souris *Fmr1*-/- et dans les lymphoblastes du patient X fragile exprimant FMRP avec la mutation ponctuelle I304N (cf introduction, § I-4-4.2-b).

Nos données suggèrent que, si FMRP ne semble pas essentielle à l'activité RISC impliquée dans le métabolisme des ARNm en condition normale, elle semble impliquée dans le métabolisme des ARNm en condition de stress.

PUBLICATION 3

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Service Commun de Documentation

Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly

Marie-Cécile DIDIOT, Murugan SUBRAMANIAN, Eric FLATTER, Jean-Louis MANDEL, and Hervé MOINE

Molecular Biology of the Cell, 2009, vol. 20, n° 1, pages 428-437

Copyright © 2009 by The American Society for Cell Biology

Publication 3: pages 101-...:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0737

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services : http://www-sicd.u-strasbq.fr/services/peb/

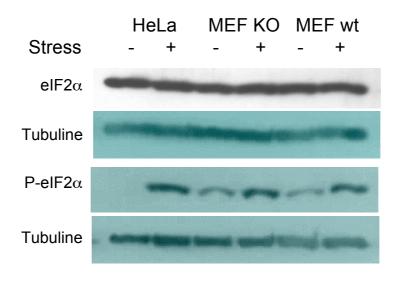


3. Etude de l'impact de FMRP sur la phosphorylation d'eIF 2α

La phosphorylation d'eIF 2α est l'une des premières étapes de la formation des granules de stress. En effet, en réponse à un stress, les cellules induisent l'activation de kinases, différentes selon le stress, qui phosphorylent eIF2α (cf introduction, § IV-4-4.4). Le défaut de formation des granules de stress dans les fibroblastes nous a amené à analyser si FMRP a un effet en amont ou en aval de la phosphorylation d'eIF2α, et agit lors d'une des premières étapes de la formation des granules de stress dans ces cellules. Afin d'étudier l'influence de FMRP sur la phosphorylation d'eIF2α, nous avons utilisé des cultures primaires de fibroblastes en condition normale ou de stress. Les stress ont été induits par addition d'arsenite de sodium (500 µM) dans le milieu de culture pendant 30 min. La phosphorylation d'eIF2α a été analysée par western-blot comparativement à la quantité totale d'eIF2α et de tubuline (figure 37). En condition normale, comparativement aux cellules HeLa, nous avons observé dans les fibroblastes Fmr1+++ et Fmr1-+- un niveau basal de phosphorylation d'eIF2α pouvant être dû à un état minimal de stress des cellules embryonnaires en culture. En condition de stress, nous n'avons pas observé de différence de phosphorylation d'eIF2 α entre les cellules HeLa et $Fmr1^{+/+}$ et les cellules $Fmr1^{-/-}$. Ces résultats suggèrent l'intervention de FMRP dans la formation des granules de stress en aval de la phosphorylation d'eIF2α.

4. Analyse de l'impact de FMRP sur la synthèse protéique en condition de stress

Nous avons également testé l'impact d'un défaut de formation des granules de stress sur la traduction générale dans les fibroblastes $Fmr1^{+/+}$ et $Fmr1^{-/-}$. Nous avons réalisé des expériences de traduction *in cellulo* en présence de méthionine ³⁵S (Met³⁵S) dans différentes conditions : T1 (arsenite 500 μM pendant 30 min puis incubation en présence de méthionine ³⁵S pendant 2 h), T2 (arsenite 50 μM pendant 30 min, addition de Met³⁵S et incubation pendant 2h), et T3 (incubation à 43°C pendant 1 h en présence de Met³⁵S). Les protéines ont été séparées par gel polyacrylamide 10% monodimensionnel ou bidemensionnel. Les résultats montrent que les traitements de 30 min à l'arsenite 500 μM et à 43°C induisent une modification de synthèse de certaines protéines dans les cellules $Fmr1^{-/-}$ par rapport aux cellules $Fmr1^{+/+}$ (figure 38). En revanche, le traitement à l'arsenite 50 μM pendant toute la durée de la traduction induit une forte diminution générale de la synthèse protéique ne



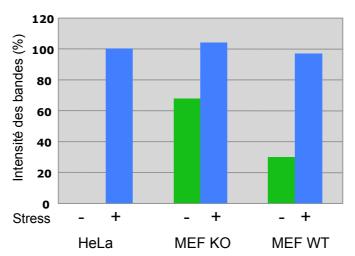


Figure 37. Effet de l'absence de FMRP sur la phosphorylation d'elF2\alpha

- a. La phosphorylation d'elF2 α a été évaluée par western-blot sur les extraits protéiques de cultures primaires de fibroblastes d'embryons murins (E14) *Fmr1*^{+/+} (WT) ou *Fmr1*^{-/-} (KO) stressées par incubation avec 500 μ M d'arsenite de sodium pendant 30 min.
- Les protéines ont été révélées avec les anticorps anti-P-elF2 α (1:1000) (#9722, *Cell Signaling*), anti-elF2 α (1:5000) (#9721, *Cell Signaling*) et anti-tubuline (1:20000). L'intensité des bandes de l'autoradiographie a été quantifiée par utilisation d'un appareil Chemigenius (*BioRad*).
- b. Le graphique représente les rapports des signaux P-elF 2α /elF 2α normalisés par la tubuline pour une expérience. La valeur 100 a été attribuée au rapport P-elF 2α /elF 2α des extraits de cellules HeLa stressées.

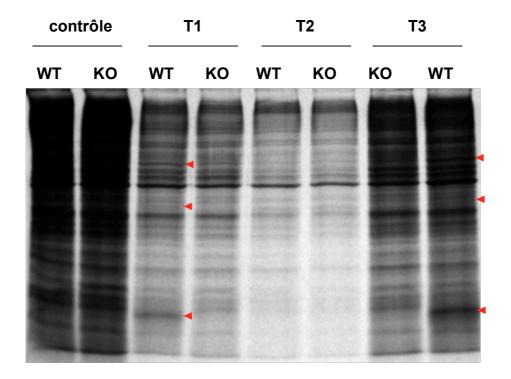


Figure 38. Marquage métabolique (35S-méthionine) dans des fibroblastes murins *Fmr1*+/+ ou *Fmr1*-/- (analyse par gel monodimensionnel)

Les extraits de cultures primaires de fibroblastes d'embryons murins (E14) $Fmr1^{+/+}$ (WT) ou $Fmr1^{-/-}$ (KO) non traités (contrôle), traités 30 min 500 μ M arsenite (T1), traités 3 h 50 μ M arsenite (T2) ou 30 min à 43°C (T3) ont été analysés par gel polyacrylamide-SDS 1D fixé, séché et soumis à autoradiographie (24 h) (cf matériels et méthodes pour les détails des traitements).

permettant pas de comparer le taux des protéines néo-synthétisées des cellules $FmrI^{-/-}$ et $FmrI^{+/+}$. Nous avons également analysé par gel bidimensionnel la synthèse protéique dans les fibroblastes $FmrI^{+/+}$ et $FmrI^{-/-}$ en condition normale ou T1 (figure 39). Nous avons identifié des signaux correspondant à des protéines dont la synthèse est dérégulée (positivement ou négativement) en condition T1, comparativement à la condition normale, dans les cellules $FmrI^{-/-}$ par rapport aux cellules $FmrI^{+/+}$ (figure 39b). Ceci suggère l'implication de FMRP dans la synthèse de protéines produites en condition de stress cellulaire. L'utilisation d'isotope radioactif empêche le recours à la spectrométrie de masse. Il faudrait envisager d'utiliser de nouvelles techniques de marquage des protéines nouvellement synthétisées comme la méthode pSILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in cultured cells) permettant l'analyse des protéines par spectrométrie de masse (Selbach et al., 2008).

5. Etude de l'impact de FMRP dans la formation des granules de stress dans les neurones

Bien qu'exprimée de manière ubiquitaire, la protéine FMRP est fortement produite dans les cellules neuronales. C'est pourquoi, après avoir étudié la formation des granules de stress dans des fibroblastes de souris $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$ en culture primaire et les lymphoblastes d'un patient X fragile, nous avons utilisé des neurones corticaux murins en culture primaire. Les cellules neuronales $Fmr1^{+/+}$ et $Fmr1^{-/-}$ ont été stressées par l'arsenite de Na, et les granules de stress ont été observés par marquage immunofluorescent de la protéine TIA-1, composant essentiel des granules de stress.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'influence de FMRP sur la formation des granules de stress en comparant leur apparition dans des cellules neuronales *Fmr1*^{+/+} et *Fmr1*^{-/-}. Le traitement des cellules à l'arsenite de sodium (250 ou 500 μM), pendant 15 ou 30 min, déclenche la formation des granules de stress de manière comparable dans les deux types de neurones (figure 40). Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence significative du nombre de granules de stress entre les cellules *Fmr1*^{+/+} et *Fmr1*^{-/-} pour chacune des concentrations en arsenite. Contrairement aux fibroblastes ou aux lymphoblastes (publication 3), les neurones *Fmr1*^{-/-} semblent moins sensibles à l'absence de FMRP, ou aussi réactives que les cellules sauvages lors de la réponse cellulaire au stress induite par un traitement à l'arsenite.

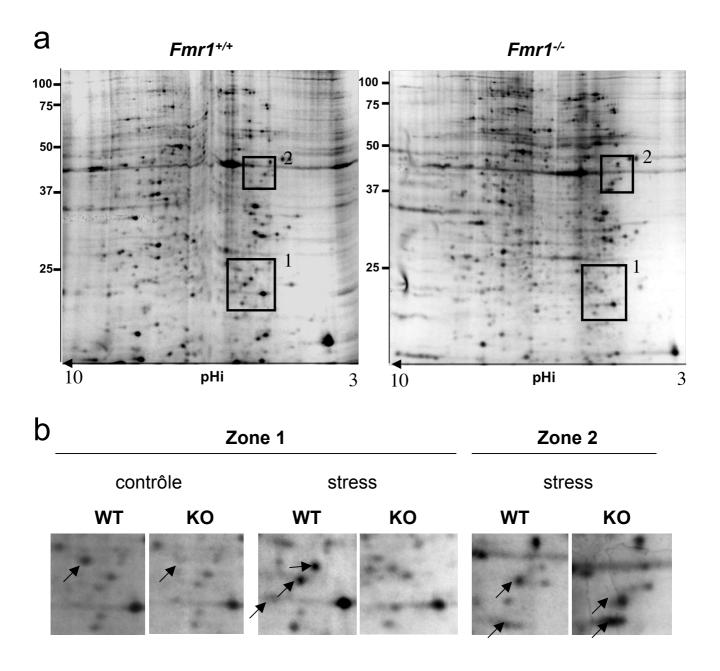


Figure 39. Marquage métabolique (35 S-méthionine) dans des fibroblastes murins $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$ (analyse par gel bidimensionnel)

Les extraits de cultures primaires de fibroblastes d'embryons murins (E14) $Fmr1^{+/+}$ (WT) ou $Fmr1^{-/-}$ (KO) non traités (contrôle) ou traités 30 min 500 μ M arsenite (T1), ont été analysés par gel polyacrylamide-SDS 2D fixé, séché et soumis à autoradiographie (72 h) (cf matériels et méthodes pour les détails des traitements).

- a. Gel 2D d'extraits de fibroblastes $Fmr1^{+/+}$ (gauche) et $Fmr1^{-/-}$ (droite) stressés avec le traitement T1. La position des marqueurs de taille et la gamme de pH sont indiquées. Les zones encadrées 1 et 2 indiquent des régions dans lesquelles une différence d'intensité de signal a été observée entre les extraits WT et KO.
- b. Zoom des zones 1 et 2. Les zooms de la zone 1 des gels WT et KO contrôle sont également représentés. Les flêches indiquent des signaux présentant des différences d'intensité dans les cellules *Fmr1*^{+/+} et *Fmr1*^{-/-}.

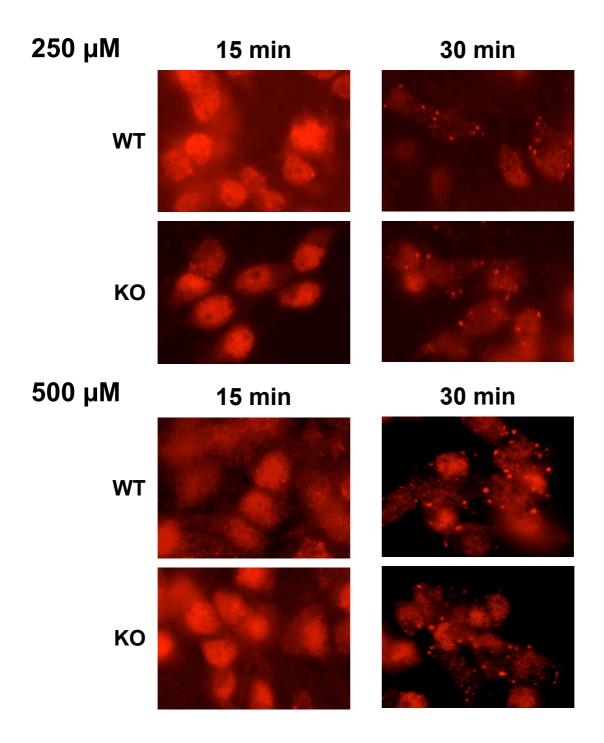


Figure 40. Formation des granules de stress dans les neurones

La formation des granules de stress a été analysée dans des cultures primaires (DIV 7) de neurones corticaux $Fmr1^{+/+}$ (WT) ou $Fmr1^{-/-}$ (KO) d'embryons (E14) de souris. Les cellules ont été stressées par addition de 250 et 500 μ M d'arsenite de sodium pendant 15 et 30 min. Les granules de stress ont été visualisés par immunocytofluorescence avec l'utilisation d'un anticorps contre TIA-1.

Nous avons alors analysé les "cinétiques" de formation et de disparition des granules de stress en fonction du temps. Les résultats obtenus après traitement des cellules à l'arsenite de sodium (500 μM) pendant 5, 10, 15, 20, 25 et 30 min ne nous ont pas permis d'observer de différence du nombre de granules de stress formés en fonction du temps entre les cellules $Fmr1^{+/+}$ et $Fmr1^{-/-}$ (figure 41). La formation des granules de stress, induite par l'arsenite, dans les cellules neuronales paraît indépendante de FMRP. D'autre part, l'analyse des granules 1 h, 2 h, ou 4 h suivant le stress, induits par un traitement à l'arsenite (500 μM) pendant 30 min, indique également que leur disparition, tout comme leur formation, semble indépendante de FMRP (figure 42). Le nombre de granules présents dans les cellules $Fmr1^{-/-}$ n'est significativement pas différent de celui présent dans les cellules $Fmr1^{+/+}$ à ces différents temps d'observation.

Contrairement aux résultats obtenus lors des expériences réalisées dans les fibroblastes et les lymphoblastes, un stress par choc thermique à 43°C pendant 15 ou 30 min n'a pas induit la formation de granules de stress dans les neurones.

6. Discussion et perspectives

L'étude de l'implication de FMRP dans la régulation de la traduction via la voie des miARN nous a permis de conclure que, de manière générale, FMRP est inutile pour le fonctionnement de la machinerie RISC. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que FMRP agisse sur l'inhibition de la traduction via des miARN particuliers, spécifiques du système nerveux central et régulant l'expression de protéines impliquées dans des processus biologiques précis comme le développement ou le fonctionnement des boutons synaptiques. L'importance de la régulation post-transcriptionnelle via les miARN dans de nombreux processus neuronaux ne fait plus aucun doute en raison de l'identification de nombreux miARN de tissus cérébraux et de cultures primaires de neurones. L'expression de certains de ces miARN est régulée temporellement et/ou en fonction du type cellulaire. Par exemple, mir-92b n'est exprimé que dans les cellules neuronales progénitrices, alors que mir-124 n'est produit que dans les cellules neuronales différenciées (Kapsimali et al., 2007). Récemment, chez les mammifères, un atlas de l'expression des miARN a été réalisé grâce au clonage et au séquençage à grande échelle des miARN (Landgraf et al., 2007). L'ensemble des études réalisées sur l'expression des miARN dans le système nerveux central (CNS) représente une base d'études fonctionnelles plus fines pour les prochaines années. Par ailleurs alors, que

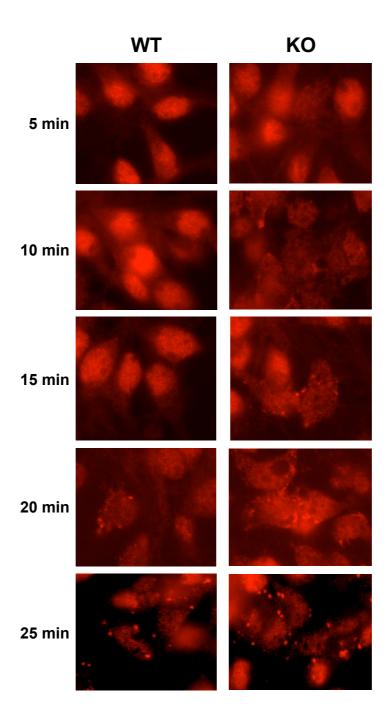


Figure 41. Formation des granules de stress dans les neurones

La formation des granules de stress a été analysée dans des cultures primaires (DIV 7) de neurones corticaux $Fmr1^{+/+}$ (WT) ou $Fmr1^{-/-}$ (KO) d'embryons (E14) de souris. Les cellules ont été stressées par addition de 500 μ M d'arsenite de sodium pendant 5, 10, 15, 20 et 25 min. Les granules de stress ont été visualisés par immunocytofluorescence avec l'utilisation d'un anticorps contre la protéine TIA-1.

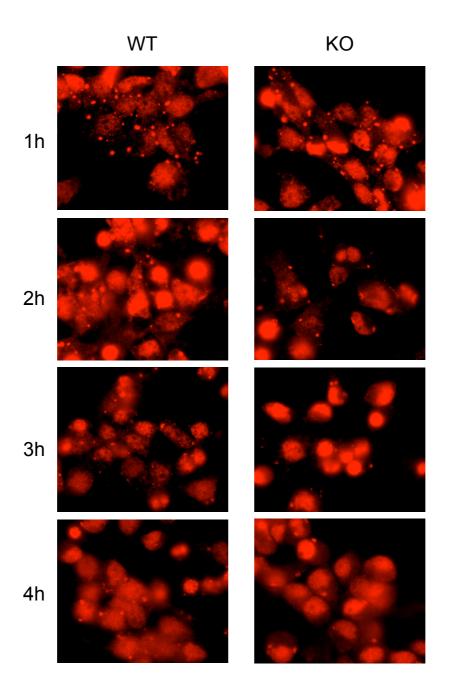


Figure 42. Etude de la disparition des granules de stress dans les neuronesLa disparition des granules de stress a été suivie dans des cultures primaires (DIV 7) de neurones corticaux *Fmr1*+/+ (WT) ou *Fmr1*-/- (KO) d'embryons (E14) de souris. Les cellules ont été stressées par incubation avec 500 μM d'arsenite de sodium pendant 30 min puis incubées 1h, 2h, 3h, ou 4h post-stress. Les granules de stress ont été visualisés par immunocytofluorescence avec l'utilisation d'un anticorps contre la protéine TIA-1.

certains miARN du CNS semblent conservés au cours de l'évolution (par exemple let-7) régulant, *de facto*, des fonctions générales du CNS, d'autres n'ont été retrouvés que chez les primates suggérant leur implication dans la grande diversité cellulaire et les fonctions cognitives cérébrales des organismes supérieurs. En se basant sur les évidences, toujours croissantes, du rôle physiologique des miARN dans le fonctionnement du CNS et en particulier le développement des épines dendritiques, il semble clair que les miARN peuvent avoir un rôle dans les maladies neurologiques. Il est intéressant de constater que l'altération morphologique des épines dendritiques observée lors de la perturbation d'un miARN (mir-134) est fortement évocatrice de celle retrouvée dans de nombreuses formes de retard mental comme le syndrome de l'X fragile (Schratt et al., 2006). Ces résultats, associés aux interactions génétique et biochimique entre FMRP et les composants de la machinerie RISC, ont contribué à suggérer que les déficits cognitifs des patients X fragile pourraient être en partie dus à la perturbation de la traduction des cibles miARN.

Au vu de ces données et de nos travaux sur l'absence de liens direct entre FMRP et les composants du RISC, il serait important d'identifier s'il existe des facteurs auxiliaires, non pas impliqués dans la régulation de la traduction avec les miARN, mais impliqués dans leur transport jusqu'aux synapses et la régulation de leur fonctionnement local dans un contexte spécifique comme la stimulation synaptique. FMRP pourrait être l'un de ces facteurs. L'étude de l'influence de FMRP sur la régulation de miARN spécifiques du CNS serait possible grâce à la transfection d'un gène rapporteur pourvu d'une région 3' UTR cible de FMRP dans les neurones, comme par exemple *PSD-95*, et comportant la cible d'un miARN neuronal spécifique. L'activité du gène rapporteur pourrait être mesurée à partir d'extraits de cultures primaires de neurones $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$ soumises ou non à une stimulation synaptique. Ce test devrait permettre de vérifier si FMRP intervient dans la régulation de l'expression de ce gène rapporteur soumis à la machinerie RISC *via* un miARN spécifique et si cette régulation est dépendante de l'état physiologique des cellules neuronales.

Dans les cellules, FMRP est retrouvée dans des complexes mRNP associés aux ribosomes, ainsi que dans des foci impliqués dans le transport dans les neurites (granules neuronaux) (De Diego Otero et al., 2002), et le stockage (granules de stress) (Mazroui et al., 2002) d'ARNm dont la traduction est réprimée. Les études que nous avons réalisées, et celles d'autres laboratoires, ont permis de montrer un défaut de formation de ces granules dans les cellules (fibroblastes, lymphoblastes et neurones) *Fmr1*^{-/-} suggérant un rôle important de

FMRP dans leur formation ((publication 3, Didiot et al., 2008 en révision MBC); (Aschrafi et al., 2005)).

Au cours de nos derniers travaux, nous avons pu mettre en évidence un impact de FMRP sur la formation des granules de stress dans les fibroblastes et les lymphoblastes mais pas dans les neurones. Ceci pourrait être dû au fait que les neurones ont une sensibilité à l'arsenite différente de celle des fibroblastes et des lymphoblastes. La nature et la composition pourraient également être différentes entre neurones fibroblastes/lymphoblastes. Quoiqu'il en soit, la présence de FMRP dans les granules de stress neuronaux consolide l'hypothèse selon laquelle FMRP serait impliquée dans la régulation des ARNm dont la traduction est inhibée. Le défaut de formation des granules de stress dans les fibroblastes et les lymphoblastes Fmr1^{-/-}, pourrait avoir un lien avec le défaut de formation des granules d'ARN neuronaux décrit dans les neurones Fmr1^{-/-} (Aschrafi et al., 2005). La présence de FMRP dans ces granules pourrait jouer un rôle dans le contrôle spatiotemporel de la traduction d'ARNm spécifiques en réponse à l'activité synaptique. FMRP pourrait également être impliquée dans la régulation de la composition de ces granules grâce à ces capacités de dimérisation et d'interaction protéine-protéine (par exemple avec d'autres protéines des SG comme Tdr3 (Linder et al., 2008)).

La formation des granules de stress serait conduite par la protéine TIA-1 grâce à ses propriétés d'agrégation de son domaine riche en glutamines. Si FMRP possède, comme TIA-1, des propriétés d'agrégation, celles-ci pourraient être établies *in vitro* par cross-linking des protéines grâce au glutaraldéhyde qui favorise la formation de liaisons covalentes entre les groupements amines des protéines.

FMRP possède deux protéines homologues, FXR1 et FXR2 qui possèdent les mêmes domaines de liaison à l'ARN, sont associées aux polysomes et ont été retrouvées dans les granules de stress. Le rôle des protéines FXR1 et FXR2 dans la formation de granules de stress pourrait être étudié comme décrit précédemment pour les fibroblastes de souris et les lymphoblastes de patients X fragile mais aussi en culture primaire de neurones d'embryons de souris sauvages ou knock-out pour FMRP. L'utilisation de siARN dirigés contre les protéines FXR1 et FXR2 de cellules en culture nous permettra de vérifier si ces protéines jouent un rôle comparable à FMRP et si l'absence combinée des trois protéines amplifie le phénomène.

Dans les fibroblastes, nous avons montré que FMRP semble intervenir en aval de la phosphorylation d'eIF2α, étape importante de la formation des SG. Dans ces cellules, nos travaux préliminaires ont montré un défaut de synthèse de certaines protéines en absence de FMRP en condition de stress. Ces données suggèrent que des défauts de stockage d'ARNm

dans les SG pourrait altérer la synthèse des protéines dont la traduction est activée/réprimée en réponse à un stress. Afin de vérifier cette hypothèse, l'identification des protéines concernées paraît essentielle. L'utilisation de la technique de pSILAC pourrait être un moyen élégant. Les résultats préliminaires d'analyse de l'expression protéique de cellules Fmr1^{-/-} en condition de stress ont révélé un changement d'expression de protéines synthétisées. Ces protéines pourraient être identifiées par des gels SDS-PAGE à deux dimensions suivis de spectrométrie de masse. Des expériences de western-blot en utilisant des anticorps spécifiques de ces protéines, et des Q-PCR sur leur ARNm, nous permettront de déterminer si FMRP intervient positivement ou négativement sur leur expression. L'implication de FMRP dans le métabolisme des ARNm codant pour ces protéines pourrait également être analysée, et la présence de motifs particuliers dans ces ARNm pourrait être recherchée (G-quartet, SodSlip (§ III) ?). Des expériences de RT-PCR quantitative permettraient de définir si FMRP a une influence sur la stabilité des ARNm et agit au niveau post-transcriptionnel ou, comme pour Sod1, si FMRP favorise le recrutement des ARNm dans les polyribosomes (gradient de sucrose et PCR quantitative). En fonction des résultats obtenus (nombre de gènes candidats), une étude microarray avec des puces d'expression (plateforme microarray, IGBMC), permettrait d'identifier l'ensemble des ARNm présents dans les polysomes en condition de stress et en présence ou en absence de FMRP. Les ARNm des SG pourraient être isolés par immunoprécipitation sur les fractions cytoplasmiques après pontage aux UV avec un anticorps anti-TIA1 marqueur des granules de stress selon la technique CLIP (Ule et al., 2005) et analysés par RT-PCR.

III. L'ARNm *Sod1*, NOUVELLE CIBLE, NOUVEAU MOTIF RECONNUS PAR FMRP

1. Objectifs de l'étude

FMRP contient différents domaines de liaison aux ARN suggérant qu'elle peut interagir avec différents motifs ARN. Jusqu'à présent, deux motifs ARN consensus interagissant avec FMRP ont été identifiés : le quartet de guanines et le "Kissing Complex". Les G-quartets, liés par le domaine RGG, sont présents dans plusieurs des cibles de FMRP identifiées *in vitro* et *in vivo*. En revanche, le "Kissing Complex", identifié *in vitro* par SELEX et lié par le domaine KH, n'a jusqu'à présent été retrouvé dans aucune cible ARNm naturelle de FMRP. Plusieurs études visant à identifier l'ensemble des ARNm régulés par FMRP avaient caractérisé des ARN cibles potentielles ne présentant apparemment pas les deux consensus (Darnell et al., 2005b; Miyashiro et al., 2003). En collaboration avec le laboratoire du Dr. Barbara Bardoni, nous avons participé à l'étude d'un tel ARNm : l'ARNm de la protéine Super Oxyde Dismutase 1, SOD1. L'ARNm *Sod1* est une cible réelle de FMRP et un nouveau motif reconnu par FMRP a été caractérisé : le motif <u>Sod1</u> Stem <u>L</u>oops Interacting with FMRP ou motif SodSLIP.

2. Publication 4

Dans cette étude, E. Bechara, du laboratoire du Dr B. Bardoni, a montré, en collaboration avec notre laboratoire, que FMRP reconnaît spécifiquement un nouveau motif, SodSLIP. Ce motif, formé de trois structures en tige-boucle, est reconnu par FMRP avec une affinité d'interaction comparable à celle observée pour les motifs G-quartets. Alors que le niveau global de l'ARNm *Sod1* reste identique entre les souris *Fmr1*^{+/+} et *Fmr1*^{-/-}, le niveau d'expression de la protéine SOD1 est plus faible dans les cellules et tissus cérébraux de souris *Fmr1*^{-/-}. L'analyse quantitative de l'ARNm *Sod1* dans les fractions polysomales montre qu'il est moins présent dans les polysomes de souris *Fmr1*^{-/-} comparativement au polysomes de souris *Fmr1*^{+/+}. L'ensemble de ces données suggère que l'interaction FMRP/SodSLIP favorise le recrutement de *Sod1* au niveau des polysomes et donc que FMRP module positivement la traduction de *Sod1*. Dans ce travail en collaboration avec l'équipe du Dr

Barbara Bardoni, j'ai participé à montrer que l'insertion du motif SodSLIP dans la région 5' UTR d'un gène rapporteur augmente à elle seule l'expression du gène rapporteur dans les fibroblastes et les cellules neuronales. La présence de FMRP accroît cet effet positif sur la traduction du gène rapporteur suggérant qu'elle favorise la traduction de SOD1 *via* le motif SodSLIP.

PUBLICATION 4

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Service Commun de Documentation

A Novel Function for Fragile X Mental Retardation Protein in Translational Activation

Elias G. BECHARA, Marie Cecile DIDIOT, Mireille MELKO, Laetitia DAVIDOVIC, Mounia BENSAIS, Patrick MARTIN, Marie CASTETS, Philippe POGNONEC, Edouard W. KHANDJIAN, Hervé MOINE, Barbara BARDONI

The Public Library of Science (PLoS), PLoS Biology, 2009, vol.7, n° 1 : e1000016, open access

Publication 4 : p 110-... :

La publication présentée ici dans la thèse est accessible en accès libre sur le site de l'éditeur : http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pbio.1000016

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services : http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/



1

A NOVEL FUNCTION of FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN in

TRANSLATIONAL ACTIVATION

Elias G. Bechara^{1,2}, Marie Cecile Didiot^{3,4,5,6}, Mireille Melko^{1,2}, Laetitia Davidovic^{1,2},

Mounia Bensaid^{1,2}, Patrick Martin^{2,7}, Marie Castets^{3,4,5,6}, Philippe Pognonec^{2,7}, Eduoard W.

Khandjian⁸, Hervé Moine^{3,4,5,6} and Barbara Bardoni^{1,2}*.

1. CNRS, UMR6097 – Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660, Route des

Lucioles, 06560 Valbonne, FRANCE

2. Universite de Nice Sophia-Antipolis, 06107 Nice-France

3. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries/BP

10142/67404 Illkirch CEDEX / France

4. CNRS, UMR 7104 - 1 rue Laurent Fries / BP 10142 / 67404 Illkirch CEDEX / France

5. INSERM, U596 - 1 rue Laurent Fries / BP 10142 / 67404 Illkirch CEDEX / France

6. Université Louis Pasteur1, Strasbourg, France

7. CNRS, FRE3094 - Parc Valrose-06108 Nice CEDEX 2

8. Centre de Recherche "Robert Giffard", Université Laval, Québec, Canada

Running Title: FMRP MODULATES SOD1 mRNA TRANSLATION

*Corresponding author: bardoni@ipmc.cnrs.fr, Tel: +33493957755 Fax: +33493957708

1

Abstract

Fragile X syndrome, the most frequent form of inherited mental retardation, is due to the absence of FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), an RNA-binding protein involved in several steps of RNA metabolism. Up to date, two RNA motifs have been found to mediate FMRP/RNA interaction: the G-quartet and the «kissing complex», which both induce translational repression in the presence of FMRP. We show here a new role of FMRP as a positive modulator of translation. FMRP specifically binds *Superoxide Dismutase 1* (*Sod1*) mRNA with high affinity through a novel RNA motif, SoSLIP (*Sod1* mRNA <u>Stem Loops Interacting with FMRP</u>), which is folded as three independent stem-loop structures. FMRP induces a structural modification of the SoSLIP motif upon its interaction with it. SoSLIP also behaves as a translational activator, whose action is potentiated by the interaction with FMRP. The absence of FMRP results in a decreased expression of *Sod1*. Since it has been observed that brain metabolism of *FMR1* null mice is more sensitive to oxidative stress, we propose that the deregulation of Sod1 expression may be at the basis of several traits of the physiopathology of the Fragile X syndrome, such as anxiety, sleep troubles and autism.

Introduction

Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) is an RNA binding protein whose absence causes the Fragile X syndrome, the most frequent form of inherited mental retardation [1]. An increasing body of evidence suggests that FMRP has a complex function, reflecting its involvement in the control of hundreds of mRNA targets via its different RNA-binding domains. Indeed, FMRP contains two KH domains and one RGG box, which can mediate RNA/protein interaction [1]. While a specificity of binding for the KH1 domain was not proved, the KH2 domain was shown to specifically bind a category of synthetic aptamers (« kissing complex »), a sequence-specific element within a complex tertiary structure stabilized by Mg⁺⁺ [2]. On the other hand, the RGG box is able to bind G-quartet RNA with high affinity [3]. This structure is present in several FMRP mRNA targets, such as FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1), MAP1B (Microtubules Associated Protein 1B) and PP2Ac (Protein Phosphatase 2A catalytic subunit) [3], [4], [5]. FMRP is able to shuttle between nucleus and cytoplasm, where it is mostly associated to polyribosomes, suggesting an implication in translational control [1]. In neurons, FMRP is also involved in RNA trafficking along dendrites and axons, being a component of RNA granules and functioning as a molecular adaptor between these complexes and the neurospecific KIF3C kinesin [6],[7]. Moreover, after traveling along dendrites, FMRP associates to polyribosomes localized at the synapse to participate in the translational control of proteins synthesized in this compartment [8].

Taking into consideration the results obtained from different laboratories, several mechanisms of action of FMRP have been proposed suggesting: i) Polysomal stalling for *MAP1B* mRNA expression regulation [9]; ii) Retention of mRNAs in translationally inactive mRNPs via its interaction with the "kissing complex" motif [2]; iii) Inhibition of translation preventing ribosome scanning via a G-quartet structure localized in the 5'UTR of a target mRNA, as for the *PP2Ac* mRNA [5]. Moreover, the ability of FMRP to stabilize the *Post Synaptic Density 95* (*PSD95*) mRNA, by interacting with its 3'UTR, was recently reported [10]. Here we show that FMRP interacts with the *Super Oxide Dismutase 1* (*Sod1*) mRNA

with high specificity and affinity *via* a novel RNA structure, that we named SoSLIP (<u>So</u>d1 <u>Stem Loop Interacting with FMRP</u>). SoSLIP is organized in a triple stem-loop structure and acts as a FMRP-dependent translational enhancer and as a mild IRES (Internal Ribosome Binding Site) in a FMRP-independent manner. The characterization of this novel RNA motif interacting with FMRP sheds new light on the ability of this protein to bind mRNAs and to improve the translation of SoSLIP-containing mRNAs. Our results, taken together with other recent findings [11] [12], suggest that the deregulation of Sod1 expression has probably an important role in the pathogenetic mechanism of Fragile X syndrome.

Results

FMRP binds Sod1 mRNA with high affinity via its C-terminal domain

With the goal to find novel mRNA structures specifically recognized by FMRP, we performed a systematic analysis of known FMRP mRNA targets, focusing on those that have been shown to interact in vivo with FMRP by the APRA (Antibody-Positioned RNA Amplification) technique [13]. First, we excluded the presence of already known structures bound by FMRP in these mRNA targets by screening their capacity to bind a recombinant FMRP in the presence of Na⁺, K⁺ or Mg⁺⁺. Indeed, K⁺ ions stabilize the G-quartet RNA structure, leading to a robust interaction with FMRP [4], while Mg++ favors FMRP/Kissing complex RNA interaction [2]. This analysis resulted in the characterization of FMRP/Sod1 interaction, which takes place in the presence of K+ (Fig.1A) and is not affected by the presence of Na⁺ (Fig.1B), while, as expected, Na⁺ affects the binding of FMRP to the N19 sequence that contains the G-quartet present in FMR1 mRNA (nts 1470-1496) [4]. Moreover, to definitely exclude the presence of a G-quartet structure in Sod1 mRNA, we performed a reverse transcriptase (RT) elongation reaction, as previously described [4]. In the presence of K⁺, G-quartet RNA is very stable, blocking RT progression at its 3' edge and resulting in a truncated transcription product. Conversely, in the presence of Na⁺, Gquartet structures are destabilized and the RT can proceed to the end of the RNA [4] . The RT elongation test on Sod1 mRNA did not reveal any K⁺ dependent stop of the polymerase (Supplementary Fig. 1), demonstrating that Sod1 mRNA is not able to form a G-quartet structure. Moreover, FMRP/Sod1 interaction was not dependent on the presence of Mg++, which is necessary to stabilize the "kissing complex" RNA structure (data not shown) [2]. Taken together, these findings suggest that FMRP binds to Sod1 mRNA via a novel sequence/structure. We continued the characterization of FMRP/Sod1 mRNA interaction by testing the ability of Sod1 mRNA to compete the binding of FMRP/Gquartet RNA structure [4]. Indeed, 5 nM of unlabelled Sod1 mRNA competed very efficiently (65%), with the previously identified N19 FMRP binding site in a gel-shift assay while a negative control, N8 RNA (corresponding to nt 1-654 of FMR1 mRNA that does not contain the G-quartet), was not able to compete the same interaction (Fig.1C). To precisely define the region of Sod1 mRNA interacting with FMRP, we generated 3 different constructs from Sod1 encompassing its full-length cDNA: its 5'UTR and a portion of its coding region (Sod1-5'region), a central part of the coding region (Sod1-mid region) and a fragment overlapping the end of the coding region and the 3'UTR (Sod1-3' region) (Fig.2A). RNA sequences corresponding to each fragment were produced and tested for their ability to interact with FMRP. Only the Sod1-5' region (spanning nt -70 to +148 of Sod1 mRNA) competed with N19 binding to FMRP with the same affinity as the full-length Sod1 mRNA (3 nM of both cold probes compete 50% of N19/FMRP binding) (Fig.2B). To identify the sequence of Sod1 mRNA that is recognized and bound by FMRP, we employed a site boundary determination method [4]. In this experiment the 3'- or 5'- end labeled Sod1-5' RNA was treated by mild alkaline hydrolysis in order to generate a pool of smaller fragments. The RNA fragments retaining the capacity to bind FMRP were selected on immobilized GST-FMRP, as previously described [4]. Bound RNAs were analyzed by electrophoresis on a denaturing polyacrylamide gel (not shown). The border positions were at -30 and +34 for 3'- and 5'-end labeled fragments, respectively. This technique allowed us to define a 64-base region spanning both sides of the Sod1 AUG start codon that is protected by FMRP. We subcloned this sequence and we synthesized its corresponding RNA, generating the Sod1-64 RNA. This RNA was bound specifically by FMRP, since it was able to compete the FMRP/Sod1 full-length mRNA interaction (Fig.2C). Interestingly, this interaction could be competed by the N19 G-quartet-containing RNA to the same extent (data not shown).

To assess which portion of FMRP was able to interact with *Sod1* mRNA, we produced protein fragments of the different RNA binding domains of FMRP (e.g. KH1, KH2, KH1/2 and RGG box-containing-C-terminal domains) as recombinant proteins in a bacterial system [14], and we used them in binding assays with the *Sod1-64* RNA. Interestingly, we observed that *Sod1-64* RNA interacts only with the C-terminal domain of FMRP encompassing the RGG box (Fig.2D) and was not able to interact with any of the KH

domains, even at high protein concentration (Fig.2D). As described previously, the same C-terminal domain was also able to the G-quartet RNA structure [3].

To assess whether *Sod1-64* RNA binds FMRP in the same ionic conditions as the full-length *Sod1* mRNA, we performed a binding assay in the presence of either K⁺ or Na⁺. As shown in Figure 2E, no differences were observed in the RNA/protein interaction in both conditions.

In addition, we tested the ability of different Fragile X Mental Retardation Protein (FXR1P) isoforms to bind *Sod1*, as we have previously done for G-quartet RNA structure [15]. We used FXR1P Iso e (only expressed in muscle), Iso a and Iso d (highly expressed in brain but not in muscle) in a filter binding assay using *Sod1* as probe. We observed that all FXR1P isoforms bind *Sod1* mRNA with lower affinity compared with FMRP. However, substantial differences exist among the 3 isoforms. Indeed the affinity of Iso e for *Sod1* is quite high, since approximately 20nM of competitor RNA is able to displace 50% of Iso e from *Sod1*. Conversely, the affinity of Iso a and Iso d is very low. These findings are shown in Supplementary figure 2.

Structure of the Sod1 mRNA region interacting with FMRP

To unravel the mechanism of action of *Sod1-64*/FMRP interaction in translational control we decided to determine *Sod1-64* RNA structure in the absence and in the presence of FMRP. To determine the secondary structure of *Sod1-*64 RNA, we probed the structure of this 64-base region in solution, using a panel of chemical and enzymatic modifications, as described [16]. This technique is based on the reactivity of RNA molecules towards chemicals or enzymes that modify or cleave specific atomic positions in RNA. The probing experiments were performed using unlabeled or radioactively end-labeled *in vitro*-transcribed RNAs (*Sod1-5* region), which were subjected to random digestion with RNases T1, T2, V1 or chemical modifications with dimethyl sulfate (DMS) and a carbodiimide derivative (CMCT). RNase T1 cuts after guanine residues in single-stranded regions, RNase T2 cleaves after all single-stranded residues, but preferentially after adenines, whereas RNase V1 cuts at double-stranded or stacked bases. DMS alkylates

the N1 position of adenines and N3 of cytosines while CMCT modifies N1 of guanines and N3 of uridines. The sites of cleavage or modification were then identified by primer extension with reverse transcriptase, using a radiolabeled primer complementary to the *Sod1-5*'region. Analysis of the resulting cDNAs was performed on sequencing polyacrylamide gels that were run together with the corresponding RNA sequencing ladder to allow identification of the modified residues (Supplementary Fig.2). A secondary structure model was further derived by combining experimental data and free energy data calculated using the mFOLD program (http://helix.nih.gov/apps/bioinfo/mfold.html). The structure of *Sod1-*64 RNA appears as a succession of three independent stem-loop structures that are separated by short single stranded regions (Fig.3A). *Sod1-64* appears strongly conserved at the sequence and structure level also in rat and human (Fig.3B and 3C). We called this FMRP-interacting structure SoSLIP (Sod1 Stem Loops Interacting with FMRP).

We then analyzed the SoSLIP structure by RNA protection after incubation with FMRP. SoSLIP RNA was treated by V1 nuclease, DMS and Pb⁺⁺ in the absence or in the presence of increasing amounts of recombinant FMRP. The modified RNA was reverse transcribed using the radiolabeled primer IV, the obtained products were separated by PAGE gel (Fig.4A). Protections and increases of reactivity were found within a region extending from nucleotides 10 to + 43 (Fig4B). Interestingly, lead, a probe specific of unpaired nucleotides, flexible regions and protein binding site, with no base specificity, revealed protections over this whole area. Because of their extent, these protections indicate a combination of both direct protections from the protein and strengthening of the structure. Noticeably, the hyper reactive positions 26 and 27 in L3 were particularly protected by the protein. A modification of the SoSLIP structure is further indicated by the increases of reactivity observed with V1 cleavages (For example, the (A) base of *Sod1* starting codon AUG and its preceding base (C), as well as the second stem and the more 3' part) (Fig. 4B). In conclusion, these data indicate that FMRP protects the RNA particularly at the level of L2 and L3 loops and induces conformational changes of the L2

and L3 stems, with a possible expure of several nucleotides, and in particular the AUG sequence in L2 stem, in the presence of the protein.

Role of FMRP in stability and translatability of Sod1 mRNA

We investigated the impact that the absence of FMRP has on the stability and translatability of Sod1 mRNA. To explore Sod1 mRNA decay we blocked transcription in primary cultured hippocampal neurons and in STEK cell lines by Actinomycin D treatment. We did not observe any significant difference in Sod1 mRNA levels even after twelve hours of Actinomycin D treatment of neurons obtained from wild-type or Fmr1 null mice (Fig.5A) or fibroblasts expressing or not a FMR1 transgene (Fig.5B). Then, we analyzed the level of Sod1 expression in cytoplasmic RNA extracts from STEK cells [5], total brain, hippocampus and cerebellum of mice expressing or not the FMR1 gene. Using quantitative (q) RT-PCR, the amount of Sod1 mRNA was found to be equivalent in both wild type and Fmr1 knock-out cells and tissues when normalized to the level of Hprt mRNA (Fig.5C). All these data excluding the fact that FMRP would regulate the stability of Sod1 mRNA, we investigated the role of FMRP on Sod1 mRNA translatability. FMRP being a well-known polyribosome-associated protein in brain [2], [17], [18], [19], and all tissues and cell lines analyzed [20], [21], we studied the distribution of Sod1 mRNA on polyribosomes derived from extracts of STEK cells expressing or not a FMR1 transgene and from brain extracts of wild type and FMR1 null mice. We used the polyribosomes purification procedure previously described [19] since this method is based on the concentration of polyribosomal franctions, avoiding contamination of light mRNP. In the absence of FMRP, we observed a decreased level of Sod1 mRNA in polyribosome fractions (medium and heavy) obtained from fibroblasts, as quantified by qRT-PCR (Fig.5D), as well as in the corresponding polyribosomal fractions obtained from total brain (Fig.2E). These results suggest that the absence of FMRP plays a key role in Sod1 mRNA incorporation in the translating machinery.

Sod1 expression is impaired in FMR1 null mice

To assess whether the reduction of the association of *Sod1* mRNA to polyribosomes impairs the expression of the Sod1 protein in the absence of FMRP, we analyzed total protein extracts obtained from STEK cells expressing or not a *FMR1* transgene [5] and we observed that Sod1 protein expression is reduced around 40 % in *Fmr1* null cells, as compared to cells expressing FMRP and after normalization of its expression to that of β-tubulin (Fig.6A). Similarly, we observed a significant decrease of Sod1 level in total protein extracts from whole brain (Fig.6B), hippocampus (Fig.6C) and cerebellum (Fig.6D) of 12 day-old *Fmr1* null mice, as compared to wild type littermates. Sod1 levels were also reduced in *Fmr1* null mice embryos at 10*dpc* (Fig.6E). We therefore concluded that Sod1 levels are directly correlated to the reduced association of its mRNA on medium and heavy-sedimenting polyribosomes in *Fmr1* null mice, suggesting that FMRP promotes the association of *Sod1* mRNA to actively translating polyribosomes.

Role of the complex SoSLIP/FMRP in translation

To confirm the positive role of FMRP in translational modulation of Sod1 expression by the interaction with the SoSLIP RNA structure, we cloned this sequence upstream of the luciferase gene in the pcDNA3.1 zeo vector to evaluate the effect of the presence of SoSLIP on the expression of a reporter protein. We transfected primary cultured hippocampal neurons with the SoSLIP-luciferase vector or with the pcDNA3.1 zeo vector and we tested luciferase activity, showing on average an 8 folds increase when SoSLIP is placed upstream of the reporter (Fig.7A). A similar result was obtained in *FMR1* expressing STEK cell (Fig.7A). Analysis of luciferase mRNA levels tested by qRT-PCR revealed that the presence of SoSLIP did not affect the mRNA expression level or stability of the dowstream reporter gene (Supplementary Figure 4 A,B). These results indicate that SoSLIP behaves *per se* as a translational activator in both cell types. We then transfected the same plasmid in primary hippocampal neurons obtained from normal and *Fmr1*-null mice and in STEK cells expressing or not the *FMR1* transgene. Indeed, the presence of FMRP induces a significant two-fold increase of luciferase activity in both cell types (Fig.7B), if compared with the luciferase activity expressed by pcDNA3.1 zeo vector-

luciferase. These data suggest that the presence of FMRP potentiates the ability of the SoSLIP sequence to positively modulate the expression of a downstream coding sequence, independently of the cellular type. In addition, our findings are not compatible with the sole proposed role of FMRP as a translational repressor [1]. To test the functional importance of SoSLIP stem loops, we disrupted each of the 3 stem-loops by site-directed mutagenesis (Fig.7C). Using filter binding assay, we then tested the ability of each mutant to compete the binding of the wild-type SoSLIP structure to FMRP. As shown in Fig 7D the SL1 mutant is able to fully compete SoSLIP binding (4 nM of cold SL1 probe competes 50% of wild type SoSLIP), indicating that the disruption of SL1 does not affect FMRP/SoSLIP interaction. Conversely, the two SL2 and SL3 mutants poorly compete out SoSLIP binding to FMRP (60 nM of both cold probes compete 50% of SoSLIP). The disruption of these two stem-loops reduces their affinity for FMRP binding (Fig 7D), but did not abolish this binding, as suggested by comparing with the competition of a RNA sequence not bound by FMRP (Fig.7D, 3'UTR Sod1 RNA as cold competitor). All 3 mutations affect the SoSLIP translational enhancer properties, reducing the level of luciferase activity (Fig.7E), if compared with the luciferase activity expressed by pcDNA3.1 zeo vector-luciferase. In Fmr1 knock-out cells the two SL2 and SL3 mutants have a reduced translational enhancing activity compared with that observed in wild-type cells (Fig 7E), confirming the data obtained by the *in vitro* binding. Surprisingly, the absence of FMRP does not modify the impact of SL1 mutant on luciferase activity (Fig.7E), suggesting that also the SL1 integrity is necessary for the correct function of FMRP. To confirm that the effect of the mutants was only affecting translation efficiency, the expression and the stability of the mRNAs of all 3 SoSLIP-luciferase mutants were tested and no differences were observed with the wild-type mRNA, in the presence or in the absence of FMRP (Supplementary Figure 4A,B,C,).

These results suggest a complex translational regulation of Sod1 mRNA *via* the SoSLIP structure.

SoSLIP acts as an IRES-like element in a FMRP-independent manner

Due to its properties on translation, we asked then whether SoSLIP may act as an IRES (Internal Ribosome Entry Site). For this purpose we used the pPRIG-HA-red bicistronic vector, where DsRed and eGFP are under the control of the same promoter. The DsRed is translated in a cap-dependent manner, while eGFP is translated only if an IRES sequence is cloned in front of it, as described [22]. We removed the IRES sequence (pPRIGempty) and we cloned the SoSLIP sequence between the dsRed and the eGFP cDNAs (SoSLI-PRIG) (Fig.8A). After 48h of transfection, Hela cells were analyzed by FACS and the eGFP intensity was quantified for 200,000 cells expressing DsRed at a constant intensity. As shown in Figure 8B, we did not observe any green fluorescence in cells transfected with pPRIGempty, confirming that the eGFP is not expressed in the absence of an upstream IRES sequence. Conversely, when SoSLIP is placed upstream of eGFP cDNA, green fluorescence becomes readily detectable. However, in this case the mean eGFP fluorescence intensity was 5.4 fold less than when using the strong viral IRES in pPRIG-HA (250 and 1400 Arbitrary Units, respectively). The same result was observed following transfection of the neuroblastoma NG108 cell line, neurons, COS cells and STEK expressing FMR1 (data not shown). No differences were observed in the intensity level of GFP fluorescence from the SoSLI-PRIG vector in cells expressing or not FMRP, suggesting that this protein is not required for the mild IRES-like activity of SoSLIP (Fig8C). Even if FMRP cannot be considered as an ITAF (IRES Translational Activating Factor), the observation that SoSLIP may act as an IRES-like sequence is important to understand the role of SoSLIP in translational control. To confirm this result we produced mRNAs encoding luciferase and SoSLIP-luciferase carrying or not the cap modification and we translated in vitro equal amounts of each mRNA in rabbit reticulocyte lysate (RRL) and in wheat germ (WG) extract. As expected, luciferase mRNA is translated with higher efficiency when the mRNA is capped. In the presence of SoSLIP, luciferase is translated in a cap-independent manner with an efficiency comparable to that obtained in the capdependent manner (Fig.8D). The same result was obtained for the translation of Sod1 mRNA in the capped and not-capped version (Fig.8D). No differences were observed using either the RRL or WG systems.

Discussion

The primary function of FMRP resides in its ability to bind mRNAs. Despite the importance of this function, the RNA-binding specificity of FMRP is not completely understood [23]. Up to date only a single structure, the G-quartet, was found to mediate the specific interaction of FMRP with several of its target mRNAs [4],[5],[24]. A synthetic RNA with a specific structure, called the "kissing complex", binds FMRP with high affinity but has not been found in any naturally occurring mRNA [2],[24]. The G-rich 3'UTR of PSD95 mRNA has been reported to interact with FMRP and the authors claimed that this interaction happens via a novel motif [10]. The structure of this motif was never defined, but a sequence highly similar (95%) to the G-quartet consensus previously determined [3] is present in the 3'UTR of PSD95, strongly suggesting the presence of a G-quartet in PSD95 mRNA [25]. Other mechanisms depending on interaction of FMRP with non coding mRNAs are controversial [26]. In conclusion, the specific sequence/region mediating the interaction of most putative mRNA targets with FMRP has been not experimentally defined. It is thought that elucidating the functional significance of the FMRP/RNA interaction is a critical step to understand the molecular bases of Fragile X syndrome. Based on conclusions from several laboratories, it has been considered that FMRP behaves exclusively as a translational repressor [27], [4]. Recent studies have proposed a more complex function of FMRP, possibly depending on the specific binding of its target RNAs or on conformational changes in its structure or on the influence of FMRPinteracting proteins [13], [1], [28]. Furthermore, the related member of the FXR family, Fragile X Mental Retardation Related Protein 1 (FXR1P) was reported to function as a translational activator when associated with the TNF α ARE in response to serum starvation [29].

In this study, we define a new function of FMRP by dissecting the mechanism of binding of FMRP to the *Sod1* mRNA, that was previously identified as an "*in vivo*" target of FMRP in cultured primary neurons [13]. Here we show that FMRP recognizes *Sod1* mRNA via a

novel motif, SoSLIP, organized in three stem loops separated by short sequences. In the absence of FMRP, Sod1 mRNA association to polyribosomes is reduced and Sod1 protein is less expressed in brains and cell lines from FMR1 knock-out mice, suggesting that Sod1 expression is positively modulated by the interaction between SoSLIP and FMRP. We have shown that the presence of FMRP protects the L2 and L3 loops of the SoSLIP structure. From our analysis, it is clear that this interaction promotes structural modifications around the AUG start codon of Sod1 mRNA and the more 3' end portion of SoSLIP. These structural modifications apparently favor translation. SoSLIP is able to positively modulate the expression of a reporter gene, whose translation is also significantly increased by the presence of FMRP. We generated 3 mutants, each one impairing the formation of the 3 stem-loops, respectively. All 3 mutants have a negative impact on the translational effect of SoSLIP. In addition, the absence of FMRP reduces the translational efficiency of the SL2 and SL3 mutants. These data suggest that when SL2 is mutated, SL1 and SL3 activity are probably still present, with SL3 activity being abolished in the Fmr1 null cells. In a similar way, when SL3 is mutated, the activity of SL1 and SL2 is still observable in wild-type cells. These data are consistent with the in vitro binding results showing an interaction of FMRP with the L2 and L3 loops and with the finding that in both mutants the FMRP/SoSLIP interaction is reduces but do not completely abolished. Interestingly enough, the SL1 mutation does not impair the binding of FMRP to SoSLIP but blocks its activity as a translational enhancer. We propose that the structural alteration due to the disruption of the SL1 stem prevents the conformational changes in SoSLIP structure upon interaction with FMRP, that should promote translational activation. In this case, even if FMRP can recognize and bind SL2 and SL3 via the two loops structures, its function is abolished. Alternatively, FMRP needs the interaction with a factor/s (probably binding to SL1) to carry out its function as a enhancer of translation. Due to the conformational changes of L2 and L3 stems induced by FMRP, we therefore propose that FMRP would facilitate ribosome scanning by participating in the remodelling of the SoSLIP structure, promoting in particular the exposure of the AUG of Sod1 mRNA. This function is possibly cooperating with factor/s binding the SL1 stem-loop. Furthermore, our data suggest that the mechanism of action of FMRP is dependent on the type of RNA structure to which it binds. FMRP binds both G-quartet and SoSLIP RNAs through its C-terminal region containing the RGG-box, even if in different ion concentrations. For this reason, it is tempting to speculate that, *in vivo*, the local ionic environment modulate the RNA binding-properties for FMRP and favor either the binding of G-quartet or SoSLIP-containing mRNAs. This possibility might be particularly relevant in the synaptic compartment, as the binding of FMRP to its different mRNA targets might be directly modulated by depolarization.

In conclusion SoSLIP can be considered as a "bipartite" translational activator: one domain (SL2 and SL3) acts in a FMRP dependent-manner, the other (SL1) is independent from the presence of the fragile X protein. Moreover, we also observed that SoSLIP may act as an IRES (Internal Ribosome Entry Site)-like sequence. We observe that FMRP does not promote and/or influence this additional function of SoSLIP, suggesting that a specific mechanism of translational regulation is probably activated to translate SoSLIP-containing-uncapped-RNA. These data confirm the complexity of the translational regulation mediated by SoSLIP and further studies will be necessary to fully understand its mechanism of action. Mostly important for our study, in this context, the function of FMRP is relevant to positively modulate SoSLIP-containing mRNA synergizing with other factor/s.

Sod1 is a well known protein with anti-oxydant properties. Alterations of oxidative stress have been proposed to exist in *FMR1* null flies since changes in the expression of proteins involved in redox reactions have been observed (1-cys peroxiredoxin in brain and peroxiredoxin and thioredoxin peroxidase in testis) [30],[31] This modest impact of the absence of FMRP on brain oxidative stress might be due to the complex regulation of Sod1 expression and by the fact that the two FXR1P isoforms most expressed in the brain (Iso a and Iso d) are also able to bind SoSLIP, even if with a lower affinity if compared with FMRP, suggesting that they can partially rescue FMRP function in *Fmr1* null cells. In

addition, the FXR1P muscular isoform (Iso e) could functionally replace FMRP in muscle cells where this protein is absent. Moreover, modifications of oxidative stress have been linked to anxiety [32], sleep troubles [33], and autism [34], all phenotypic characters displayed by Fragile X patients [35]. At the molecular level, Sod1 has been indicated as a regulator of growth factor signaling. In particular, Sod1 inhibition may attenuate pERK signalling [12]. In this sense, it is remarkable that the rapid activation of ERK1/2 after mGluRI stimulation is altered in *Fmr1* null mice [36], suggesting that reduced expression of Sod1 may contribute to this phenotype in *Fmr1* null synapses. In conclusion, our study suggests a role of Sod1 in physiopathology of Fragile X syndrome and proposes a new function and novel mechanism of action for FMRP.

Materials and methods

Plasmids constructions

Primer sequences used to amplify Sod1 and FMR1 cDNAs are summarized in Table I.

Mouse full-length *Sod1* (BC002066), and two of its deletion constructs (mid region and *Sod1-64/*SoSLIP) were subcloned into the pGEM-T vector (Promega), *Sod1* 3'UTR construct was subcloned into the pCR2.1-TOPO (Invitrogen). SL1, SL2 and SL3 mutants were generated starting from Sod1-64 pGEM-T vector and using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the oligos described in Table I.

SoSLIP and its 3 mutants were cloned in pcDNA3.1 zeo (Invitrogen) using Sod1-64/SoSLIP HindIII primers escribed in Table I, generating SoSLIP-luciferase and *SL1*-luciferase, *SL2*-luciferase and *SL3*-luciferase constructs

Sequences coding for KH1, KH2, KH1/2 and FCT domains were amplified by PCR from obtained from *FMR1* ISO7 cDNA [14] using the appropriate primers. The PCR products were subcloned into the pET 151/DTOPO vector (Invitrogen) and the constructions verified by sequencing.

pPRIG-empty: the IRES sequence was removed by digestion of pPRIG-HA-red [22] with Sall and HindIII, filling in with the Klenow large fragment of DNA polymerase I, and religation. SoSLI-PRIG was obtained by replacing the IRES Sall-HindIII fragment of pPRIG-HA-red with double stranded oligonucleotides (see Table I) representing the sequence of SoSLIP. All constructs were verified by DNA sequencing.

Immunoblot analysis

Protein extraction and immunoblot were performed as previously described [5]. The antibodies used in immunoblot analyses were used at the following concentrations: anti-FMRP antibody 1C3 1:10000 [5], rabbit polyclonal anti-Sod1 antibody (Sod-100) (Stressgen) 1:5000, monoclonal anti β-Tubulin (E7) antibody (Iowa Hybridoma Bank) 1:5000 and rabbit polyclonal anti-L7a antibody (a gift from A. Ziemiecki) 1:40000.

Protein expression

Recombinant proteins expression and purification were performed as previously described [28]. *In vitro* translated proteins (luciferase and SoSLIP–luciferase) were produced using the RRL/WGE combination system (Promega). The mRNAs translated (luciferase, SoSLIP–luciferase *and Sod1*) in this *in vitro* reactions were produced using the T7 RNA polymerase (Promega) and using the mMessage machine kit (Applied Biosystem) specific for the synthesis of cap-modified mRNA. In both cases we followed the manufacturer protocol starting from linearized plasmids.

RNA binding assay

All RNAs were produced using the T7 RNA polymerase (Promega), according to the manufacturer protocol starting from linearized plasmids. The pGEM-T and pTL1 vectors were linearized using PstI, pCR2.1 TOPO with BamH1. *Sod1 5'* region was obtained by digesting pGEM-T *Sod1* full-length with BstXI. Restriction enzymes were purchased at New England Biolabs. RNAs were purified on NucAway spin columns (Ambion) and their quality was verified on an Acrylamide-Urea gel after staining with Stains-All (Sigma). RNA-Protein interactions were analyzed either by electro mobility ahift assay or by filter binding assay, as previously described [4]. All the experiments have been repeated at least 3 times. All values obtained are listed in Table II.

RNA forming structures detection

The presence of a G-quartets structure in the *Sod1* mRNA was tested both by binding assay and by reverse transcription with different primers along the *Sod1* mRNA, as previously described, in the presence of Na+ or K+ in both experiments [4]. For the primer extension assays, RT was performed as described and using the following γ -³²ATP 3' end labeled primers [4].

I 5'CTCTTCAGATTACAGTTT3'; primer II 5'GTACGGCCAATGATGGAATG3'; primer III 5'GGATTAAAATGAGGTCCTGC3'; primer IV 5'CTTCTGCTCGAAGTGGATG3'; primer V 5'CTTCAGCACGCACGC3'.

The Sod1-64 RNA boundaries were determined as previously described [4].

Cells culture and transfections.

Primary cultures of hippocampal neurons were obtained from wild type and *FMR1* null mouse embryos at 18 days of gestation. Primary cultures of cortical neurones were grown into 24-wells format plates in 500 µl Neurobasal Medium (*Gibco*) supplemented with 1x B27 (*Gibco*), 0.5 mM L-glutamine in presence of 100 lU/ml penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂. STEK *FMR1* null cells and its derivative stably transfected with *FMR1* cDNA [5] were grown as previously described [5]. Before transfection, cells were incubated in antibiotic-free medium. For luciferase assay: transfections were performed in triplicate with Effectene (Invitrogen) as described by the manufacturer with 50 ng of the reporter gene (SoSLIP-FIRFLY Luciferase) and 5 ng of the plasmid, coding for the *Renilla* luciferase used as a normalizer for each well.

For RNA stability: STEK cells and 10 days *in vitro* cultured neurons were treated with 5 μM of actinomycin D (Sigma) for 2, 4, 6 and 12 hours. Total RNAs was purified from actinomycin-treated cells using the Qiagen RNeasy Mini Kit and the RNA quality was verified on a 1% agarose gel and by OD measurement.

Luciferase assays. Assays were performed 12h after transfection. Starting from cell monolayers in 24-well cluster dishes, Renilla and Firefly luciferase activities were determined using the Dual Luciferase Assay System (Promega) and following the manufacturer's protocol. Luciferase activities were measured using a LuminosKan Ascent luminometer. Arbitrary Units (AU) of luciferase activity were calculated accordingly the protocol of the luminometer manufacturer (Thermo Labsystem). In each transfection, Firefly luciferase values were normalized with Renilla luciferase values.

Chemical and enzymatic probing of the *Sod1*-5'UTR region to determine the SoSLIP structure.

5'UTR of Sod1 RNA (5pmoles) was renatured at 40°C for 15 min in the appropriate native buffer (50 mM Hepes buffer pH 7.5 for DMS or Borate buffer pH 8 for CMCT, 5 mM Mg Acetate, 50 mM KOH acetate, 2 mM β -mercaptoethanol). Chemical modifications were performed in 20 μ l final volume using either 1 μ l of DMS diluted 1/2 (v/v) in ethanol or 60

μg of CMCT (Carbodiimide), at 20°C for 5 and 15 min, respectively and in the presence of 2μg of *E. coli* tRNA. Enzymatic modifications were performed with V1 (0.0002U and 0.001U), T1 (0.05U, and 0.1U) and T2 (0.05U and 0.1U) nucleases, followed by a phenol/chloroform (v/v) extraction. After ethanol precipitation and solubilization in the appropriate buffer, modified RNAs were reverse transcribed using labeled primer III, sequencing reactions and gel analysis were carried out as previously described [16]. In the presence of FMRP, experiments were performed using recombinant His-FMRP produced in a bacterial system [28] and GST-FMRP produced in a baculovirus system [4]. In the second case protein was used attached to the glutathione-beads treated with BSA (1 g/ I final concentration). RNA was incubated with the same amount of pre-treated beads.

Polyribosomes Purification.

Polyribosomes purification and analysis was performed following our previously described protocol [19], with minor modifications. Briefly, 1% Nonidet P-40 (NP-40) was added to the postmitochondrial supernatant, and 7 ml of the solution was layered over a 3-ml pad made of 45% sucrose in an 11-ml tube and centrifuged in a Sorvall TH-641 rotor at 34,000 rpm for 3 h. The ribosomal pellets were then resuspended in a buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.4 100 mM KCl 1.25 mM MgCl2, 0,5% NP40, 1u/ml RNAsin). Resuspended polyribosomes were analyzed by 15–45% sucrose gradients composed of 25 mM Tris HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl2, 1u/ml RNAsin. After centrifugation in a Sorvall TH-641 rotor for 2 h at 34,000 rpm and 4°C, gradients were fractionated by upward displacement using an ISCO UA-5 flow-through spectrophotometer set at 254 nm and connected to a gradient collector. Fifteen fractions of 800 μl each were collected from sucrose gradient. 100 μl of each fraction were ethanol-precipitated, resuspended in 50 μl of Laemmli buffer and analyzed by immunoblot. The remaining 700 μl of each fraction were treated with Trizol (Invitrogen) to purify RNA. The quality of RNAs was verified on a 1% agarose gel and by OD measurement.

Real Time PCR

The reverse transcription reactions were performed with $2\mu g$ of RNA using the ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen). All mRNAs extracted from transfected cells were treated with DNase I (4U for each RT reaction) 1h at 37° C before to be reverse transcripted. DNAse was removed by phenol-chloroform treatments, and the mRNA recovered after ethanol precipitation. The PCR reactions were carried out with the qPCR core Kit for Syber Green I (Eurogentec), in an ABI PRISM 7000 instrument (Applied BioSystems). Primes used to amplify Sod1 and the control Hprt are indicated in Table I Relative changes in mRNA amounts were calculated based on the $\Delta\Delta_{CT}$ method [38]. 3 independent polyribosomal purifications were carried out for brain extracts and for STEK cells extracts.

FACS analysis

Cells were transfected for 48h and after washing in PBS were analyzed with a FACScalibur instrument (Becton Dickenson BD system). Cells expressing DsRed, with a constant intensity, were selected and the mean of the eGFP intensity (expressed as arbitrary units) of each sample was measured with the instrument software. The experiment was repeated 3 times in HeLa cells, COS cells, STEK cells expressing or not FMRP, NG108, hippocampal primary neurons.

Acknowledgment

We thank Enzo Lalli for discussion and critical reading of the manuscript and Jean-Louis Mandel for discussion. We are indebted with A. Ziemiecki for his kind gift of anti-L7a anti-serum. We are grateful to Solange Pannetier, Josiane Grosgeorge and Julie Cazareth for the excellent technical support.

This study was supported by INSERM, CNRS, Agence Nationale de la Recherche (BB and HM), Fondation Jerôme Lejeune (BB), GIS-Maladies Rares (BB) and CHU de Nice. EWK is supported by CIHR. EB and MM have been supported by Fondation pour la Recherche Médicale. MCD is recipient of a fellowship from ARC. LD is a recipient of a intraeuropean fellowship from the Marie Curie 6th Framework Program.

BB dedicates this manuscript to the memory of Prof. Marco Fraccaro.

The authors have declared that no conflict of interest exist.

References

- 1. Bardoni B, Davidovic L, Bensaid M, Khandjian EW The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. Expert Rev Mol Med. 2006; 8: 1-16.
- 2. Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, et al. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev. 2005; 19: 903-918.
- 3. Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, et al. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. Cell. 2001; 107: 489-499.
- 4. Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, et al. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. EMBO J. 2001; 20: 4803-4813.
- 5. Castets M, Schaeffer C, Bechara E, Schenck A, Khandjian EW, et al. FMRP interferes with Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. Hum Mol Genet. 2005; 14: 835-844.
- 6. De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, et al. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. Mol Cell Biol. 2002; 22: 8332-8341.
- 7. Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, et al. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. Hum Mol Genet. 2007; 16: 3047-3058.
- 8. Grossman AW, Aldrige GM, Weiler IJ, Greenough WT. Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. J Neurosci. 2006; 26: 7151-7155.
- 9. Lu R, Wang H, Liang Z, O'donnell WT, Li W, et al. The fragile X protein controls microtubules-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. Proc Nat Acad Sci USA. 2004; 101: 15201-15206.

- 10. Zalfa F, Eleuteri B, Dickson KS, Mecaldo V, De Rubeis S, et al. A new function for fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. Nat Neurosci. 2007; 10: 578-587.
- 11. El Bekay R, Romero-zerbo Y, Decara J, Sanchez-Salido L, Del Arco-Herrera I, et al. Enhanced markers of oxidative stess, altered antioxidants and NADPH-oxidase activation in brains from Fmr1-deficient mice, a pathological model for fragile X syndrome. Eur J Neurosci. 2007; 26: 3169-3180.
- 12. Juarez JC, Manuia M, Burnett ME, Betancourt O, Boivin B, et al. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H2O2-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. Proc Nat Acad Sci USA. 2008; 105: 7147-7152.
- 13. Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, et al. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. Neuron. 2003; 37: 417-431.
- 14. Adinolfi S, Bagni C, Musco G, Gibson TJ, Mazzarella L, et al. Dissecting FMR1, the protein responsible for Fragile X syndrome, in its structural and functional domains. RNA. 1999; 5: 1248-1258.
- 15. Bechara E, Davidovic L, Melko M, Bensaid M, Tremblay S, et al. Fragile X related protein 1 isoforms differentially modulate the affinity of fragile X mental retardation protein for G-quartet RNA structure. Nucleic Acids Res. 2007; 35: 299-306.
- 16. Brunel C, Romby P. Probing RNA structure and RNA ligand complexes with chemical probes. Methods Enzymol. 2000; 318: 2-21.
- 17. Stefani G, Fraser CE, Darnell JC, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. J Neurosci. 2004; 24: 9272-9276.
- 18. Aschrafi A, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW. The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 2180-2185.

- 19. Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, et al. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. Proc Nat Acad Sci USA. 2004; 101: 13357-13362.
- 20. Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, et al. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. Hum Mol Genet.1997; 6: 1465-1472.
- 21. Feng Y, Absher, D, Eberhart DE, Yi H, Brown V, et al. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. Mol. Cell. 1997; 1: 109-118.
- 22. Martin P, Albaghi O, Poggi MC, Boulukos KE, Pognonec P. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. BMC Biotechnol. 2006; 6: 4.
- 23. Darnell JC, Mostovetsky O, Darnell RB. FMRP RNA targets: identification and validation. Genes Brain Behav. 2005; 4: 341-349.
- 24. Khandjian EW, Bechara E, Davidovic L, Bardoni B. Fragile X Mental Retardation Protein: many partners and multiple targets for a promiscuous function. Current Genomics. 2005; 6: 515-522.
- 25. Todd PK, Mack KJ, Malter JS. The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD 95. Proc Nat Acad Sci USA. 2003; 100: 14374-14378.
- 26. Iacoangeli A, Rozhdestvensky TS, Dolzhanskaya N, Tournier B, Schutt J, et al. On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 734-739.
- 27. Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that Fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. Hum Mol Genet. 2001; 10: 329-338.
- 28. Bechara E, Davidovic L, Melko M, Bensaid M, Tremblay S, et al. Fragile X related protein isoforms differentially modulate the affinity of fragile X mental retardation protein for G-quartet RNA structure. Nucleic Acids Res. 2007; 35: 299-306.

- 29. Vasudevan S, Steitz JA. AU-Rich-Mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute. Cell. 2007; 128: 1105-1118.
- 30. Zhang YQ, Friedman DB, Wang Z, Woodruff Er, Pan L, et al. Protein expression profiling of the drosophila fragile X mutant brain reveals up-regulation of monoamine synthesis. Mol Cell Proteomics. 2005; 4: 278-290.
- 31. Zhang YQ, Matthies HJ, Mancuso J, andrews HK, Woodruff E, et al. The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. Dev Biol. 2004; 270: 290-307.
- 32. Gingrinch JA. Oxidative stress is the new stress. Nature. 2005; 11: 1281-1282.
- 33. Cirelli C. Sleep disruption, oxidative stress, and aging: new insights from fruit flies. Proc Nat Acad Sci USA. 2006; 103: 13901-13902.
- 34. Ming X, Stein TP, Brimacombe M, Johnson WG, Lambert GH, et al. Increased excrection of a lipid peroxidation biomarker in autism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006; 73: 379-384.
- 35. Hagerman RJ, Cronister A. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research.

 3rd edn. Johns Hopkins University Press. Baltimore.(1996)
- 36. Kim SH, Markham JA, Weiler IJ, Greenough WT. Aberrant early-phase ERK inactivation impedes neuronal function in fragile X syndrome. Proc Nat Acad Sci USA. 2008; 105: 4429-4434.
- 37. Livak KJ, Schmittgen TD () Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. Methods Enzymol. 2001; 25: 402-408.

Figures Legends

Figure 1. FMRP specifically binds *Sod1* mRNA.

FMRP binding to *Sod1* mRNA is not dependent on K⁺. Labelled G-quartets RNA (N19) or *Sod1* full length mRNA were incubated with increasing amounts of recombinant His-FMRP in the presence of K⁺(A) or Na⁺(B). FMRP-*Sod1* binding was not affected by ionic conditions while, as expected, the presence of Na⁺ affected FMRP binding to N19.

(C) Gel-shift experiments were performed using a ³²P-labeled N19 probe incubated with 0.1 pmole of recombinant His-tagged FMRP, in the presence of increasing amounts of unlabelled competitors, ranging from 10⁻⁹ to 10⁻⁷M [lane 3-5 (N19), lane 6-8 (*Sod1*), lane 9-11 (N8)]. Lane 1, no protein control, lane 2, no competitor control. Note that both N19 (G-quartets-containing RNA and positive control) and *Sod1* compete equally for binding to FMRP, whereas N8 (negative control) only competes out at high concentration (non-specific binding).

Figure 2. FMRP binds a 64 base fragment of Sod1 mRNA via its C terminal region.

- A) Schematic representation of *Sod1* mRNA and the fragments subcloned from full-length cDNA and used to map the binding domain of FMRP on *Sod1* mRNA.
- B) Binding specificity of FMRP to *Sod1*-5' region. Filter binding assay using FMRP and ³²P-labeled N19. The competition was performed using various regions of unlabeled *Sod1* mRNA:, *Sod1*-5' region, *Sod1* mid region, and *Sod1*-3' region and N19 itself. The graph depicts the fraction of bound labelled N19 RNA plotted against unlabelled competitor RNA concentration.
- C) Binding specificity of FMRP to *Sod1-64* fragment. Filter binding assay using FMRP and ³²P-labelled *Sod1* mRNA. Competition was performed with different unlabelled mRNA fragments, as indicated in the figure The *Sod1-64* RNA fragment shows a competition profile similar to the one of *Sod1* full-length mRNA.
- D) Filter binding assays using various recombinant RNA-binding domains of FMRP. KH1, KH2 and the C-terminal domain containing the RGG box and ³²P-labeled RNAs reveal

that the FMRP C-terminal domain (FCT) displays equal affinity for *Sod1* mRNA or G-quartet (N19 fragment), whereas the two KH domains are not able to bind *Sod1* mRNA.

E) Filter binding assay using increasing amount of recombinant His-FMRP and ³²P-labeled RNA fragments in the presence of K⁺ or Na⁺. FMRP-*Sod1*-64 RNA binding is not dependent on ionic conditions, excluding the presence of a G-quartets forming structure RNA. All values are listed in TableII.

Figure 3. Secondary structure of the SoSLIP RNA fragment

A) RNA secondary structure model of mouse *Sod1-64* RNA fragment (SoSLIP) showing results from enzymatic cleavage and chemical modification experiments. White and black arrows represent weak, moderate and strong RNase T1 cleavage sites, respectively. White and black triangles represent weak, moderate and strong RNase V1 cleavage sites, respectively. Symbols used to indicate the reactivity of different drugs or nucleases are shown on the picture, "x" represents reverse transcriptase pauses.

- B) Alignment of SoSLIP sequence in mouse, rat and human
- C) Conservation of the SoSLIP RNA secondary structure in rat and human

Figure 4 Chemical and enzymatic probing of the SoSLIP and its resulting secondary structure in presence and in absence of FMRP

A) PAGE gel showing the running of retro transcribed SoSLIP RNA after treatment with Rnase V1 (left), DMS (middle) and lead (right). "c" indicates the lane where SoSLIP was untreated, the lane "1" is the treated RNA and lanes "2 and 3" represent the SoSLIP RNA after incubation with increasing amount of FMRP before to be treated as described. The position of nucleotides are indicated together with the region corresponding to the second (L2) and third (L3) loops.

B)The SoSLIP structure was reported indicating the symbol by the cross the nucleotides that appeared more reactive towards V1 DMS or lead. The two symbols + and - were

used to indicate an increased or decreased reactivity, respectively, upon the interaction with FMRP.

Figure 5. Stability and translatability of Sod1 mRNA

- A)Primary cultured hippocampal neurons derived from *Fmr1* knock-out or wild-type mice were incubated with 5 M Actinomycin D for 12 hours. *Sod1* mRNA levels in cells expressing or not *FMR1* was monitored at various time points after treatment. The ratio of these levels is shown.
- B) STEK cells expressing or not FMRP were incubated with 5 M Actinomycin D for 12 hours. *Sod1* mRNA levels in cells expressing or not *FMR1* was monitored at various time points after treatment. The ratio of these levels is shown.
- C) Cytoplasmic RNA was extracted from cells and mice tissues expressing or not FMRP. Sod1 mRNA levels were analysed by qRT-PCR and normalized to *Hprt* in each sample. As shown in the diagram, Sod1 mRNA levels were not affected by the absence of FMRP.
- D) Polyribosome association of *Sod1* mRNA in brain obtained from wild-type and *Fmr1* null mice. A254 profile of sucrose density gradients is shown and the 80S monosome is indicated. RNA purified from fractions corresponding to 80S and light-, medium- and heavy-sedimenting polyribosomes were pooled and the amount of *Sod1* mRNA in each pool was determined by quantitative RT-PCR, normalized to *Hprt* in each sample. *Sod1* mRNA is less associated to light polyribosomes in the absence of FMRP. Statistical analysis was performed. (Student's t-test, P< 0,01 for medium polyribosomes, Student's t-test, P< 0,05 for heavy polyribosomes). No statistical differences have been observed for light polyribosomes
- E) Polyribosome association of *Sod1* mRNA in STEK cell lines expressing or not *FMR1*. A254 profile of sucrose density gradients is shown and the 80S monosome is indicated. RNA purified from fractions corresponding to 80S and light-, medium- and heavy-sedimenting polyribosomes were pooled and the amount of *Sod1* mRNA in each pool was determined by quantitative RT-PCR, normalized to *Hprt* in each sample. *Sod1* mRNA is

less associated to light polyribosomes in the absence of FMRP. Statistical analysis was performed. (Student's t-test, p< 0.01 for medium polyribosomes, Student's t-test, p< 0.05 for heavy polyribosomes). No statistical differences have been observed for light polyribosomes

Figure 6. Decreased level of Sod1 protein in *Fmr1* null cells, brain regions, embryo Western blot analysis of one *FMR1*+ STEK clone (where *FMR1* was reintroduced) and one STEK *FMR1* null clone. The result shown on the left panel is representative of the analyzed clones. (On the right panel). Densitometric analysis showing a significant decrease of Sod1 expression, comparing five wild-type rescued clones and five *FMR1* knock-out clones. Three independent experiments were quantified. Results are the average of *Sod1* levels normalized for β-tubulin expression (Student's t-test, p< 0.01). The same analysis described in (A) was repeated for mouse total brain (B), mouse hippocampus (C), mouse cerebellum (B) and mouse 10 dpc embryo extracts (E) obtained from wild-type and *Fmr1* null mice.

Figure 7. The impact of SoSLIP and its mutants in the translational regulation

Effect of SoSLIP sequence upon luciferase expression. A) Luciferase activity of pcDNA 3.1 zeo vector or SoSLIPpcDNA 3.1 zeo (SoSLIP-luciferase) in primary neurons and STEK cells. Three independent experiments with 3 replicates for each transfection were quantified. For each transfection Firefly(F) luciferase (luc) activity was normalized by Renilla (R) luciferase (luc) activity. Results are presented as the mean ±SEM (Student's ttest, pc 0.01). RLU, Relative Luciferase Units. B) Activity of SoSLIPpcDNA 3.1 zeo (SoSLIP-luciferase) in neurons and STEK cells expressing or not FMRP. Three independent experiments with 3 replicates for each transfection were quantified. For each transfection Fluc activity was normalized by Rluc activity. Results presented here represent the mean of the ratio of SoSLIPpcDNA 3.1 zeo by pcDNA 3.1 zeo activities (Student's t-test, pc 0.01).

- C) Scheme of the SoSLIP sequence and its three mutants (SL1, SL2 and SL3).
- D) Binding affinity of FMRP to wild-type SoSLIP and SL1, SL2 and SL3 mutants. Filter binding assay using radiolabeled SoSLIP and unlabeled cold RNA competitors SoSLIP, Sod1 3' region, SL1, SL2 and SL3. All the values obtained in the filter binding assay are listed in Table II
- E) Effect of SoSLIP mutants on luciferase expression in STEK cells expressiong or not FMRP. Three independent experiments with 3 replicates for each transfection were quantified. For each transfection Fluc activity was normalized by Rluc activity. Results presented here represent the mean of the ratio of SoSLIPpcDNA 3.1 zeo by pcDNA 3.1 zeo activities (Student's t-test, p< 0.01).

Figure 8. SoSLIP acts as a FMRP independent IRES-like element

A)Representation of different constructs containing both the Ds-RED and the eGFP. These plasmids were modified by insertion of either a linker sequence (pPRIG-empty) or SoSLIP sequence (SoSLI-PRIG) or an already characterized IRES (pPRIG-HA-red).

B)Histogram representing the result of eGFP intensity (Green) of a FACScan analysis on HeLa cells transfected with either pPRIGempty vector or the SoSLI-PRIG vector or the pPRIG-HA-red vector. 200000 cells expressing DsRed with constant intensity were analyzed for each transfection Three independent experiments were quantified. The mean intensity of eGFP was calculated by FACSCAN. Statistical analysis shows a significative difference between the mean intensity of GFP obtained by pPRIGempty vector and SoSLI-PRIG vector (Student's t-test, P<0.01).

C) The same analysis described in B, was repeated in STEK cell expressing or nor the *FMR1* transgene. D) *In vitro* translated luciferase using capped and not-capped mRNA. The relative intensity of each band was evaluated by densitometric analysis and it is represented in the histogram. E) The same experiment described in "D" was repeated for the *in vitro* translation of SoSLIP-luciferase mRNA F) The same experiment described in "D" was repeated for the *in vitro* translation of *Sod1* mRNA.

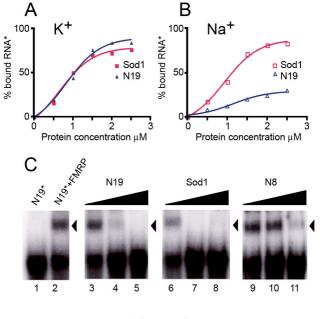


Figure 1

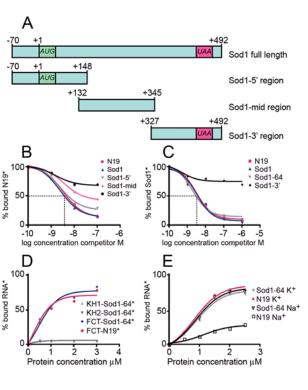


Figure 2

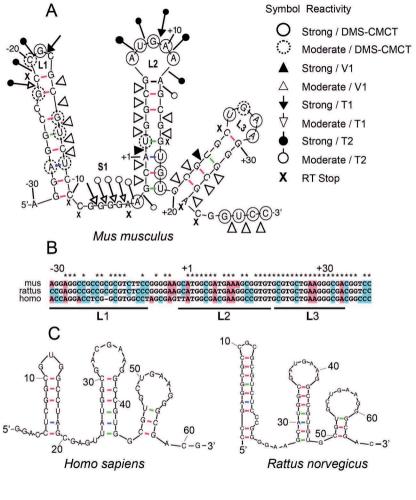
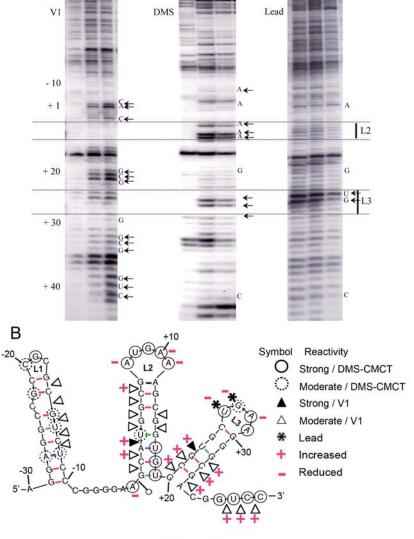


Figure 3



C 1 2

1 2 3

Α

C 1 2

Figure 4

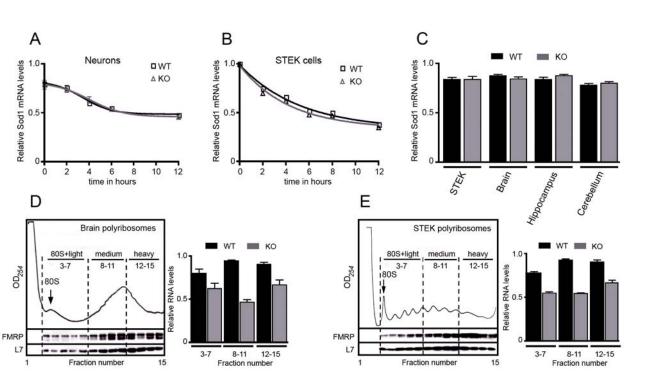


Figure 5

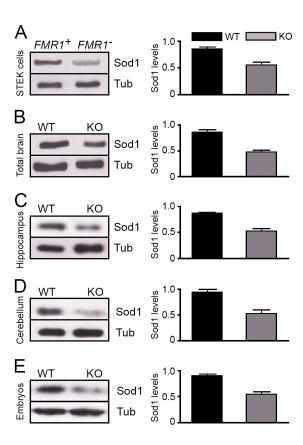
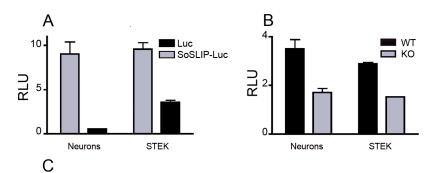


Figure 6



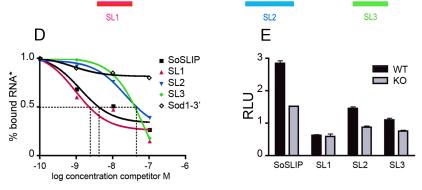


Figure 7

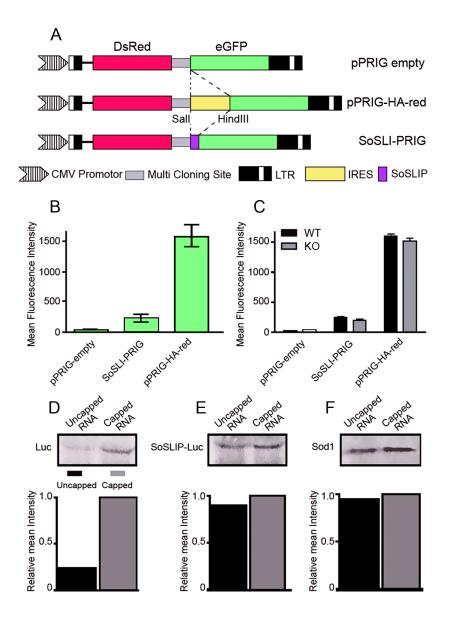


Figure 8

Table I

	Forward	Reverse
Sod1 full-length	5'CCCACGCGTCCGCTCGTC3'	5'CTCTTCAGATTACAGTTT3'
Sod1 mid- region	5'GGGTTCCACGTCCATCAGT3'	5'GGCCAATGATGGAATGCTC3'
Sod1 3'UTR	5'CCGTACAATGGTGGTCCAT3'	5'CTCTTCAGATTACAGTTTAAT3'
Sod1-64	5'CGCCGCGCGTCTTCCG3'	5'GACCGTCGCCCTTCAGC3'
FMRP-KH1	5'CACCGCTAGTAAGCAGCTGG3'	5'CTAAAATTCGAGAAAGCTTCTAG3'
FMRP-KH2	5'CACCGCTGAAGATGTAATACAAGT TC3'	5'CTATAAATAGTTCAGGTGATAATCCAA3
FMRP-FCT	5'CACCGCTCCAACAGAGGAAGAGAG 3'	5'CTAGGGTACTCCAATCACGAGTG3'
Sod1 q RT-PCR	5'ACCATCCACTTCGAGCAGAA3'	5'AGTCACATTGCCCAGGTCTC3'
Hprt q RT-PCR	5'GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC3'	5'CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA3'
SL1	5'GAGGAGGCCGCCGCGCCTCTTCCG GGG3'	5'CCCCGGAAGAGGCGCGGCGCCTCCTC 3'
SL2	5'GAAGCATGGCGATGAAACGGGACT GCGTGCTGAAGGC3'	5'GCCTTCAGCACGCAGCCCGTTTCATCGC CATGCTTC3'
SL3	5'CGTGCTGAAGGGGCACGGTCCGGT GC3'	5'GCACCGGACCGTGCCCCTTCAGCACG3'
SoSLIP/Sal1 HindIII	5'GTCGACAAGGAGGCCGCCGCGCT CTCCCGGGGAAGCATGGCGATGAAA GCGGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACG GTAAGCTTGC3'	5'GCAAGCTTACCGTCGCCCTTCAGCACGC ACACCGCTTTCATCGCCATGCTTCCCCGG GAGACGCGCGGCGCCTCCTTGTCGAC3'
Sod1-64 HindIII	5'GGAAGCTTGGAGGCCGCCGCGCGCGT3'	5'GGAAGTCCACCGTCGCCTTCAGCACGC AC 3'
Luc1 FirFly	5'GAATCCATCTTGCTCCAACAC 3'	5'TTCGTCCACAAACACAACTC3'
Luc2 Renilla	5'ATCAGGCAAATCTGGTAATG G3'	5'ACATCTACTACACTTTCAGCG T3'

3. Discussion et perspectives

En raison de ces caractéristiques anatomiques et physiologiques, le système nerveux central est particulièrement sensible au stress oxydant. En effet, en contribuant pour 20% de la consommation d'oxygène corporelle totale, le cerveau est le siège d'une production importante de ROS (Reactive Oxygen Species) à l'origine du stress oxydatif. Les ROS sont des espèces chimiques très instables susceptibles de réagir avec de nombreuses molécules de manière non spécifique dans la cellule. Leur réactivité avec l'ADN perturbe sa réplication entraînant des mutations et cancers. Leur interaction avec les lipides et les protéines pourrait induire la dérégulation des membranes cellulaires, en particulier des membranes neuronales et, de fait, perturber le développement et la plasticité des synapses à l'origine des phénomènes d'apprentissage. Les défauts de la morphologie des synapses, à l'origine des défaillances d'apprentissage et de mémorisation des patients atteints du syndrome de l'X fragile, pourraient être dus, en partie, à l'augmentation de l'oxydation des protéines et lipides membranaires chez ces patients. En accord avec cette hypothèse, il a récemment été montré que le cerveau de souris knock-out pour FMRP présente des anomalies dans le système de défense antioxydant et une augmentation de la quantité des ROS comparativement au cerveau de souris sauvages (el Bekay et al., 2007).

La diminution de l'expression de la protéine SOD1 pourrait contribuer à cet effet. En effet, SOD1 est une enzyme qui joue un rôle important dans la défense cellulaire contre le stress oxydant induit par la présence de radicaux libres car elle catalyse la réaction de dismutation du superoxyde O₂ en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Les résultats que nous avons obtenus au laboratoire sur le défaut de formation des granules de stress (Didiot *et al.*, 2008 en révision, MBC) associé à l'altération de l'expression de la protéine SOD1 (Bechara *et al.*, 2008, en révision, Plos Biology) et l'augmentation des ROS dans les cellules *Fmr1*^{-/-} (el Bekay et al., 2007), suggèrent fortement l'implication de FMRP dans la réponse cellulaire au stress, et indiquent que la dérégulation de l'expression de la protéine SOD1 dans les cellules *Fmr1*^{-/-} pourrait contribuer à la pathologie du syndrome de l'X fragile. La caractérisation d'un nouveau motif pour l'ARNm *Sod1* apporte également de nouvelles perspectives sur la capacité de FMRP à agir comme activateur traductionnel sur d'autres ARNm.

Il serait maintenant essentiel de déterminer si FMRP régule l'expression traductionnelle d'autres protéines impliquées dans des systèmes biologiques régulant le stress oxydant. L'identification des ARNm ciblés par FMRP et la caractérisation de leur motif

semble être une bonne solution dans l'étude de l'implication de FMRP dans l'homéostasie des ROS.

Il a été montré que FMRP interagit avec Rac1, une protéine de la famille des RhoGTPase (Castets et al., 2005). Rac1, impliquée dans la production de radicaux libres, agit comme sous-unité de la NADPH oxydase, une source importante de ROS dans les tissus cérébraux (Vallet et al., 2005). Or, la dérégulation de l'activité de la NADPH oxydase dans le syndrome de l'X fragile (el Bekay et al., 2007) pourrait contribuer à la surproduction de radicaux libres à l'origine du stress oxydant. Il serait important d'analyser en détail comment FMRP agit sur Rac1 et la NADPH oxydase source de stress oxydant.

Une autre source de stress oxydant chez les individus knock-out pour FMRP pourrait être liée à l'augmentation de l'expression de la protéine APP (Amyeloid-β Precursor Protein), précurseur de la protéine β-amyloide, observée chez les souris *Fmr1*. (Westmark and Malter, 2007). FMRP interagit avec l'ARNm d'APP et semble agir comme régulateur négatif sur sa traduction (Westmark and Malter, 2007). Il a été montré que l'augmentation d'APP induirait du stress oxydant car l'oxydation de la protéine β-amyloide serait l'une des premières étapes d'une réaction d'oxydation en chaîne à l'origine des dommages oxydatifs dans les neurones (Butterfield and Boyd-Kimball, 2005). Cependant, le rôle exact de l'accumulation de la protéine APP, également associée à la maladie d'Alzheimer, doit être étudié de manière plus approfondie dans le syndrome de l'X fragile. Les études sur le rôle neuronal d'APP dans la formation et la maturation des synapses (Akaaboune et al., 2000; Torroja et al., 1999) suggèrent que l'altération de son expression puisse participer aux défauts morphologiques des épines dendritiques des patients X fragile.

CONCLUSION

Depuis l'identification de FMRP comme protéine dont l'absence est à l'origine du syndrome de l'X fragile, des progrès importants ont été réalisés dans l'identification des cibles ARN de FMRP. Les différentes études réalisées au cours de cette thèse ont permis de montrer que le rôle de FMRP dans le métabolisme de ses ARNm cibles est vraisemblablement plus complexe qu'initialement supposé. FMRP est capable d'interagir avec un grand nombre d'ARNm cibles et avec des motifs structuraux différents. Jusqu'à présent, la fonction de FMRP la plus couramment proposée vis à vis des ARNm était celle de répresseur traductionnel. Ainsi, nos travaux sur l'effet de FMRP sur l'expression d'un gène rapporteur suggèrent que FMRP peut agir sur l'expression de ses différentes cibles selon différentes manières. Nos résultats montrent ainsi une action possible de FMRP sur les évènements d'épissage (Didiot et al., 2008), un effet négatif sur la traduction lorsqu'un motif G-quartet (FBS) est placé en 5' UTR, et un rôle vraisemblablement complexe lorsque le motif G-quartet est présent en 3' UTR d'un gène. Dans cette dernière situation, le contrôle ne semble pas se faire simplement via l'interaction entre FMRP et l'ARNm à réguler, mais semble dépendre de la présence d'éléments additionnels à mettre en rapport avec d'autres motifs présents en 3' UTR (sites de polyadénylation, sites de liaison d'autres protéines...). Nous avons également observé que le motif G-quartet n'est pas seul à spécifier l'action de FMRP sur un ARNm. Lorsque le motif SodSlip, nouvellement identifié, est inséré dans la région 5' UTR d'un gène rapporteur, FMRP semble favoriser la traduction de l'ARNm (Bechara et al., 2008 en révision, Plos Biology). Un autre aspect important de ce travail a été de montrer que FMRP n'est pas essentielle à l'activité de la machinerie RISC, contrairement à ce qui a été initialement proposé mais que FMRP et RISC appartiennent à des voies métaboliques distinctes. Nous avons également ouvert de nouvelles pistes pour la détermination du rôle de FMRP dans le métabolisme des ARN non traduits, en particulier leur stockage lors de la réponse cellulaire au stress (Didiot et al., 2008 en révision, MBC). L'étude de l'implication de FMRP dans le métabolisme des ARNm dont la traduction est inhibée, dans les granules de transport neuronaux et de stress, n'en est qu'à ses débuts. La présence d'autres protéines interactrices de FMRP ou de liaison à l'ARNm pourrait moduler le devenir des diverses ARNm cibles de FMRP. Il semble donc que FMRP fasse partie de mRNP de nature et de fonction différentes. La compréhension des règles d'assemblage de ces complexes, leur lien, le devenir des ARNm présents dans ces complexes et la connaissance exacte de la nature des interacteurs de FMRP permettront de formuler des hypothèses plus précises quant à son mode d'action.

En conclusion, l'ensemble des données disponibles montre que le mécanisme d'action de FMRP est complexe ou en tout cas l'interprétation de toutes ces données en un mécanisme unitaire le rend comme tel. Ces dernières années, de grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension du mécanisme du syndrome de l'X fragile, notamment par rapport à l'implication de FMRP dans les phénomènes de plasticité synaptique. Cependant, les résultats sont loin de répondre à toutes les questions et un travail important doit encore être réalisé afin de comprendre les bases moléculaires de cette maladie et d'envisager une stratégie thérapeutique efficace.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. PLASMIDES

1. Plasmides d'expression de FMRP (pTL-1-Fmr1)

Les ADNc codant pour les différents isoformes de FMRP ont été clonés dans le

plasmide pTL-1 (Sittler et al., 1996) en aval du promoteur T7 entre les sites EcoRI et Pst1.

pTL-1 est un vecteur d'expression eucaryotique permettant l'expression du gène d'intérêt

sous le contrôle du promoteur SV40.

2. Constructions pour les tests d'expression de la luciferase

2.1) Plasmides pour l'expression de la luciferase Renilla

a) Plasmide pRL-TK

La luciferase Renilla est exprimée sous contrôle du promoteur du gène codant pour

l'enzyme thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-TK) à partir du plasmide pRL-

TK (*Promega*). Nous avons choisi le promoteur HSV-TK car il induit une faible expression

constitutive du gène Renilla luciferase, et permet de ne pas saturer les cellules en ARNm

rapporteur. Différents sites de restrictions en amont et en aval du gène luciferase permettent

d'insérer les séquences dont on veut vérifier l'effet sur la traduction.

b) Constructions pRL-TK

Les fragments de PCR synthétisés, correspondant aux séquences d'intérêt, sont

purifiés par électrophorèse sur gel agarose puis isolés du gel grâce au kit "QIAquick PCR

Purification" (*Qiagen*) selon les instructions du fabricant.

- Rluc-FBScap et Rluc-FBSstart:

Hind III Nhe

Oligo 5': 5'-CCCAAGCTTCGCTAGCAGAGGAAGAGAGGGAGAGC-3'

Nhe I Hind III

Oligo 3': 5'-CCCGCTAGCCAAGCTTGAGTGATCGTCGTTTCCTTTG-3'

Matrice: pTL-1-iso7

117

Le produit de PCR a été digéré par *Hind III* et inséré dans la région 5' UTR du gène *Renilla luciferase* dans les sites de restriction *Hind III*, localisé à huit nucléotides en aval de la coiffe (FBScap), et *Nhe I*, localisé à quatre nucléotides en amont du codon d'initiation (FBSstart).

- Rluc-PP2Ac:

Hind III

Oligo 5': 5'-CAACAAGCTTGGCACGAGCGCCGAGAG-3'

Nhe I

Oligo 3': 5'-CTTAGCTAGCGGCGGCGAGCCGCGCG-3'

Matrice: (Castets et al., 2005)

Le fragment synthétisé comporte les sites de restriction *Hind III* et *Nhe I* aux extrémités 5' et 3', respectivement et a été inséré dans la région 5' UTR du gène *Renilla luciferase* entre les sites de restriction *Hind III* et *Nhe I* grâce à deux ADN double-brin adaptateurs contenant les sites de restriction *Hind III/EcoR I* et *Nhe I/Nco I* (Figure 43) :

Adaptateur 1

Hind III

Oligo sens: 5'-AGCTTGCAACCCCTTG-3'

EcoR I

Oligo antisens : 5'-AATACAAGGGGTTGCA-3'

Adaptateur 2

 $Nco\ I$

Oligo sens: 5'-CCATGTTGGTTCCAAG-3'

 $Nhe\ I$

Oligo antisens : 5'-CTAGCTTGGAACCAAC-3'

- Rluc-FBS3'

 $Sal\ I$

Oligo 5' Sal I: 5'-GCACGCGTCGACGGAGGAAGAGGACAAGGAGG-3'

BamHI

Oligo 3' BamH I: 5'-GCGGCGGGATCCTTTGAAGCCTCCTCCACGTCC-3'

Matrice: pTL-1-iso7

La séquence FBS de l'ARNm *Fmr1* a été insérée dans la région 3' UTR du gène *Renilla luciferase* entre les sites de restriction *Sal I* et *BamH I* à 30 nucléotides du codon stop

Afin d'insérer le fragment FBS en 3' UTR de *Rluc*, le vecteur pRL-TK a été modifié par mutagenèse dirigée par PCR avec le kit "QuickChange® Site-Directed Mutagenesis" (*Stratagen*) selon les recommandations du fabricant, afin de supprimé le site de restriction *BamH I* en 5' UTR et d'insérer les sites de restriction *Sal I* et *BamH I* en aval du codon stop. Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

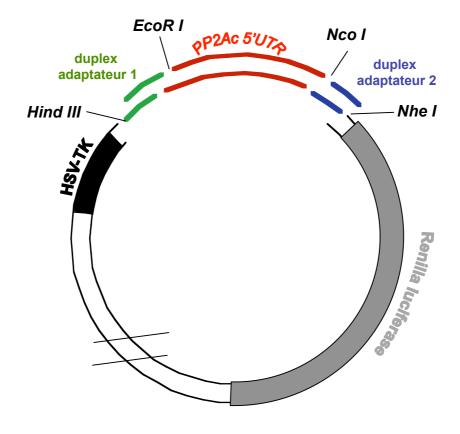


Figure 43. Schéma de la stratégie de clonage de la région 5' UTR de l'ARNm *PP2Ac* dans le plasmide pRL-TK

La région 5' UTR de l'ARNm *PP2Ac* est insérée à la place de la région 5' UTR du gène *Renilla luciferase*. Les deux adaptateurs sont indiqués en vert et en bleu. L'adaptateur 1 contient les sites de restriction *Hind III* et *EcoR I* aux extrémités 5' et 3' respectivement. L'adaptateur 2 contient les sites de restriction Nco I et Nhe I aux extrémités 5' et 3' respectivement. La région 5' UTR de l'ARNm *PP2Ac* est indiquée en rouge, le gène *Renilla luciferase* en gris et le promoteur HSV-TK en noir.

BamH I

Oligo BamH I: 5'-GTGCCACCTAGGATACTTATCGATTTTACC-3'

Oligo Sal I/BamH I:

BamH I

 $Sal\ I$

5'CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTGGATCCACTGCAGTCGACCTGCTCGA AGCGGCCGCTCTAG-3'

- Rluc-PSD837 et Rluc-PSD219

Amplification par PCR de la région 3' UTR entière (*PSD-837*) ou de l'extrémité 3' terminale (*PSD-219*) de l'ARNm *PSD-95*.

Région 3' UTR PSD-837:

Oligo 5': 5'-GAGAGAGACTCTGATTCCT-3'

Oligo 3': 5'-CAAGTATCTGTCTCTTCCT-3'

Fragment PSD-219:

Oligo 5': 5'-GGAAGGTCTAAATGTGGCT-3'

Oligo 3': 5'-CAAGTATCTGTCTCTTCCT-3'

Matrice: ADNc placentaire humain

Les fragments de PCR purifiés sont insérés dans le vecteur pCR2.1-TOPO à l'aide du kit "TOPO® TA cloning" (*Invitrogen*) selon les recommandations du fabricant. Le vecteur obtenu est digéré par les enzymes *Xba I/Spe I* et la séquence d'intérêt purifiée est sous-clonée dans le site *Xba I* de la région 3' UTR du gène *Renilla luciferase* du plasmide pRL-TK à 2 nucléotides du codon STOP.

Le plasmide Rluc-PSD837-ΔGq a été construit par Murugan Subramanian avec le kit "QuickChange® Site-Directed Mutagenesis" (*Stratagen*) selon les recommandations du fabricant.

2.2) Plasmide pour l'expression de la luciferase Firefly

La luciferase Firefly est exprimée à partir du vecteur d'expression eucaryotique, pFlashSV40 (*SynapSys*), sous contrôle du promoteur SV40. Ce plasmide, co-transfecté avec le vecteur pRL-TK, permet de normaliser le niveau d'expression de la luciferase Renilla dans les cellules eucaryotiques entre les différents essais.

II. TESTS CELLULAIRES

1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires utilisées, sont les cellules Stek et des cultures primaires de fibroblastes ou de neurones corticaux et hippocampaux. Les cellules Stek sont des fibroblastes de souris $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$ immortalisés obtenus du Dr Edouard Khandjian (Mazroui et al., 2002). Les cellules en culture primaire proviennent d'embryons (E14-E17) de souris mâles Black6 $Fmr1^{+/+}$ ou $Fmr1^{-/-}$.

1.1) Préparation des cultures primaires

a) Fibroblastes

Les cultures primaires de fibroblastes sont préparées au laboratoire par Solange Pannetier selon le protocole suivant : les embryons sont issus de souris femelles (*Fmr1*^{+/-}) croisées avec des mâles (*Fmr1*^{+/+}) au 13^{ème} ou 14^{ème} jour de gestation. Les souris sont sacrifiées par décérébration puis, les embryons sont prélevés du placenta retiré de la souris. Pendant toute la durée de la dissection, les embryons sont conservés à température ambiante dans du tampon phosphate PBS (Phosphate Buffer Saline) (*Sigma*). La tête et la queue de chaque embryon sont conservées afin de réaliser le génotypage. Le foie est retiré du reste de l'embryon. Les cellules sont dissociées dans 500 µl de PBS par plusieurs aspirations de l'embryon à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 18G. Les cellules sont mises en culture dans du milieu DMEM (*Gibco*) complémenté avec 15% de sérum de veau fœtal et 200 µg/ml de gentamycine à 37°C sous 5% CO₂ jusqu'à confluence. Les cellules sont alors diluées et incubées dans un milieu identique mais complémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Les cultures sont conservées pendant 5-6 passages.

Les fibroblastes immortalisés ou primaires sont cultivés à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (*Gibco*) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (*Sigma*) et 0,1 mg/ml de gentamycine (*Sigma*).

b) Neurones

Les cellules neuronales sont préparées à partir d'embryons issus de souris gestantes depuis 16 jours. Les souris sont sacrifiées par décérébration puis, les embryons sont prélevés du placenta retiré de la souris. Pendant toute la durée de la dissection, les embryons sont conservés à température ambiante dans du tampon phosphate PBS (Sigma) et les tissus cérébraux prélevés sont incubés dans 500 µl de tampon de dissection S1 (PBS, D-glucose 200 mg/ml, BSA 100 mg/ml, MgSO₄ 150 mM). Après une centrifugation de 1 min à 1000 rpm, le tampon S1 est éliminé et le culot de cellules est repris dans 500 µl de tampon de dissociation enzymatique S2 (S1 10 ml, trypsine 10 mg/ml, DNase 10 mg/ml) et incubé pendant 30 min à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par l'addition de 500 µl de tampon d'inhibition S4 (8,4 vol de S1, 1,6 vol S3 (S1 10 ml, SBTI 10 mg/ml, DNase 10 mg/ml, MgSO₄ 150 mM)). Après une centrifugation de 1 min à 1000 rpm, le tampon S2-S4 est éliminé et les cellules sont dissociées mécaniquement dans 500 µl de tampon S3 par une dizaine de pipetages avec un pipetmann P200. Les cellules sont ensemencées dans 500 µl de milieu DMEM (Gibco) complémenté avec 10% de sérum de cheval, 10 mM d'Hepes (Gibco), 1 µg/ml d'insuline et 200 µg/ml de gentamycine dans des plaques 24 puits. La surface des puits est préalablement traitée avec une solution de poly-lysine (0,1 mg/ml) (Sigma), qui favorise l'adhésion des cellules sur le support, pendant une nuit à 37°C. Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% CO₂ pendant la nuit puis le milieu d'ensemencement est remplacé par 500 µl de milieu de culture (§ II-1-1.2).

Les neurones sont cultivés à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu neurobasal (*Gibco*) complémenté avec du B27 1x (*Gibco*), 200 mM de L-glutamine et 100 IU/ml de pénicilline/streptomycine filtré à 0,22 μm.

1.3) Traitements des cellules

Les cellules, ensemencées en plaque 24 puits, à 80000 cellules par puit, sont stressées 16 h après soit par traitement avec un réactif oxydant, l'arsenite de sodium (250 et 500 μM) (*Riedel de Haen*) pendant 5 à 30 min, soit par choc thermique (43°C) pendant 15 et 30 min. La stimulation des neurones est réalisée à l'aide de l'agoniste des récepteurs au glutamate, le DHPG (*Tocris*) à 100 μM dont la solution stock est préparée extemporanément à 5 mM dans l'eau.

2. Transfections des cellules

Les cellules, ensemencées dans des boîtes 24 puits à 80000 cellules par puit, sont cultivées dans du milieu sans antibiotique. Les différentes constructions Renilla luciferase (0,5 μg) sont cotransfectées avec le plasmide pTL-1-iso7 ou pTL-1-iso7-I304N (0,35 μg) 1 μl de Lipofectamine[™] 2000 (*Invitrogen*). Pour chaque puit d'une boîte 24 puits, l'ADN est mis en solution dans 50 µl de milieu sans sérum, Optimem (Gibco). La Lipofectamine[™] 2000 est pré-incubée 5 min à température ambiante dans 50 µl d'Optimem avant d'être mélangé à l'ADN. Les complexes ADN/Lipofectamine™ 2000 sont formés durant 20 min à température ambiante puis ajoutés sur les cellules en culture dans 500 µl de milieu. Le milieu est remplacé après 4 h par du milieu supplémenté avec de l'antibiotique. Une heure après transfection, certaines cultures neuronales sont traitées au DHPG (100 µM) (Tocris), agoniste du glutamate, toutes les heures pendant 5 h. Les cellules sont récupérées après différents temps suivant la transfection, et la quantité de protéine Renilla luciferase produite à partir de ces différentes constructions est mesurée. Afin de normaliser les valeurs de l'activité Renilla luciferase en fonction de l'efficacité de transfection et du nombre de cellules, nous avons cotransfecté, avec chaque plasmide rapporteur, le plasmide normalisateur pFlash codant pour le gène Firefly luciferase (0,3 µg) sous contrôle du promoteur SV40.

3. Mesures des activités luciferase

Les mesures des activités luciferase Renilla et Firefly sont réalisées à différents temps suivant le traitement (cf légende des figures) à l'aide du kit "Dual-Luciferase® Reporter Assay System" (*Promega*). Les cellules sont lysées sous agitation pendant 15 min à température ambiante dans 100 µl de "Reporter Lysis Buffer" (*Promega*) fourni avec le kit de mesure. 20 µl de lysat sont déposés dans le puit d'une plaque blanche de 96 puits afin de quantifier les deux activités luciferase à l'aide d'un luminomètre à plaque (Centro XS³ LB 960, *Berthold*) comme indiqué par la fabriquant. 50 µl de tampon "Luciferase Assay Reagent II" sont injectés dans le puit contenant le lysat, après 2 sec d'agitation et 1 sec de repos, l'appareil mesure l'activité Firefly luciferase pendant 10 sec. 50 µl de tampon "Stop & Glo" sont alors injectés dans le même puit. Après 2 sec d'agitation et 1 sec de repos, l'appareil mesure l'activité Renilla luciferase pendant 10 sec. Toutes les valeurs de luciferase Firefly

sont comparées à la première valeur de luciferase Firefly du triplicat contrôle. Les coefficients de correction ainsi calculés permettent de normaliser les valeurs luciferase Renilla.

4. RT-PCR quantitative

Afin d'évaluer l'expression des ARNm *Renilla* et *Firefly luciferase*, les ARN totaux ont été extraits des cellules avec le kit "GenElute™ Mammalian Total RNA" (*Sigma*) selon les instructions du fabricant. Les transcriptions inverses ont été réalisées sur 0,5 μg d'extrait d'ARN total avec le kit "SuperScript™ III Reverse Transcriptase" (*Invitrogen*) suivant le protocole recommandé.

Les expériences de PCR quantitatives ont été réalisées sur l'appareil MX4000 (*Stratagene*) avec 10 pmol de chaque amorce, dont les couples ont été validés par courbe standard. Les amorces utilisées sont les suivantes :

- Pour l'ARNm Renilla luciferase

Oligo 5': 5'-TCTTCGTGGAAACCATGTTG-3'

Oligo 3': 5'-TGTTGGACGACGAACTTCAC-3'

- Pour l'ARNm Firefly luciferase

Oligo 5': 5'-TTCCATCTTCCAGGGATACG-3'

Oligo 3': 5'-ATCCAGATCCACAACCTTCG-3'

Les PCR quantitatives ont été réalisées sur une dilution de 1/100 de chaque échantillon de transcription inverse en triplicat avec le kit "Platinum SybrGreen qPCR SuperMix" (*Invitrogen*). 40 cycles, constitués d'une étape de dénaturation de 15 sec à 95°C, une étape d'hybridation de 30 sec à 55°C et une étape d'extension de 30 sec à 72°C, ont été effectués.

La méthode utilisée afin de quantifier la quantité d'ARNm *Renilla luciferase* présente dans nos échantillon est celle du $\Delta\Delta$ Ct. Cette technique peut être utilisée car les efficacités de PCR de notre gène d'intérêt (*Rluc*) et du gène standard (*Fluc*) sont identiques. Nous avons calculé la différence Δ Ct entre le Ct obtenu pour le gène *Rluc* et le gène *Fluc* (Δ Ct = Ct (*Rluc*) – Ct (*Fluc*)). Ce calcul est réalisé pour chaque échantillon. Un des échantillons contrôles est choisi comme valeur de référence. Le $\Delta\Delta$ Ct pour chaque échantillon correspond à la différence entre le Δ Ct de l'échantillon et le Δ Ct de référence. La formule permettant de comparer le niveau d'expression dans l'échantillon à l'échantillon de référence est $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

5. Western-blot sur eIF2α et eIF2α phosphorylée

Les fibroblastes ont été ensemencés en plaques 6 puits et stressés ou non par 500 µM d'arsenite pendant 30 min. Les extraits protéigues ont été préparés avec un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, MgCl2 2 mM, NP40 0,5%, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, antiprotease Complete EDTA-free (Roche)). Après quantification des échantillons protéiques par Bradford, 20 µg de protéines de chaque échantillon sont préparés dans du tampon de dépôt (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS 4%, Glycérol 30%, ßmercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,05%) dans un volume final de 15 µl et chauffés 3 min à 95°C. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel polyacrylamide 8% SDS dans du tampon de migration TGS (Tris 50 mM, glycine 1,4%, SDS 0,1%). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de difluoride polyvinylidène (PVDF, Immobilon-P, Millipore) préalablement activée par un bain d'éthanol pendant 1 min puis lavée 5 min à l'eau distillée et équilibrée 15 min dans le tampon de transfert (TGS, éthanol 20%). Le transfert est effectué à 200 mA pendant 1 h. La membrane est saturée dans une solution de TBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait en poudre 1 h sous agitation. La membrane est incubée séquentiellement avec les anticorps anti-eIF2α (1/1000) (#9721, Cell Signaling) ou anti-P-eIF2α (1/5000) (#9722, Cell Signaling) puis tubuline (1/20000) (#3408, Chemicon) dans 2 ml de solution de saturation la nuit à 4°C et sous agitation. Après trois rinçages dans le tampon TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween 0,1%), la membrane est incubée avec les anticorps dirigés contre les IgG de lapin pour eIF2 α (1/10000) et P-eIF2 α (1/5000) ou de souris pour la tubuline (1/40000) couplés à la peroxydase (Amersham) dans 2 ml de tampon de saturation 1 h à température ambiante et sous agitation. Après trois rinçages dans le tampon TBS-NP40, la membrane est révélée par utilisation du kit ECL Immobilon-P (Millipore) et exposée avec un film autoradiographique BioMax MR (Kodak).

6. Marquage métabolique avec la méthionine ³⁵S

Les fibroblastes en culture primaire en plaque 6 puits à 75% de confluence sont rincés avec le milieu de marquage (MM) (DMEM Met-free, glucose 1 g/l, FCS 10%, 100 IU/ml de pénicilline/streptomycine). Les cellules subissent alors différents traitements : T1, incubation dans 1 ml de MM en présence de 500 µM d'arsenite de Na pendant 30 min à 37°C, puis

rinçage avec le MM afin d'éliminer l'arsenite, puis incubation dans 1 ml de MM complémenté avec 200 μCi de Met³⁵S, 1 h à 37°C - T2, incubation dans 1 ml de MM en présence de 50 μM d'arsenite de Na, 30 min à 37°C, incubation dans 1 ml de MM complémenté avec 200 μCi de Met³⁵S, 1 h à 37°C - T3, incubation dans 1 ml de MM complémenté avec 200 μCi de Met³⁵S pendant 1 h à 43°C. Les cellules sont ensuite incubées dans 1,5 ml de MM complémenté avec 100 μg/ml de Met, 45 min à 37°C ou 43°C. Les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS, puis lysées dans 100 μl de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, MgCl2 2 mM, NP40 0,5%, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, antiprotease Complete EDTA-free (*Roche*)). 2 μl d'extraits protéiques sont déposés sur gel polyacrylamide 10% SDS monodimensionel ou bidimensionnel (Didiot et al., 2008) afin de séparer les protéines. Afin de révéler le signal des protéines néo-synthétisées en présence de Met³⁵S, le gel est mis en présence d'un film autoradiographique XAR (*Kodak*).

III. VÉRIFICATION DE LA PRÉSENCE D'UN MOTIF G-QUARTET EN RÉGION 3' UTR DE L'ARNm *PSD-95*

1. Préparation de l'ARN de la région 3' UTR de PSD-95

50 μg de plasmide "*Rluc-PSD219*" sont linéarisés avec l'enzyme de restriction *BamH I* à 5 U/μl dans 50 μl de tampon *BamH I* (*Biolabs*) complémenté avec de la BSA (400 μg/ml) pendant 1 h à 37°C. Le vecteur linéarisé est purifié, précipité et repris dans 25 μl d'eau distillée. Les fragments d'ARNm *PSD-219 ou PSD-837* est synthétisé *in vitro* à partir de 50 μg de plasmide linéarisé par transcription à l'aide de l'ARN polymérase T7 dans du tampon de transcription (*Promega*) (BSA 100 μg/ml, DTT 15 mM, spermidine 10 mM, 5 mM de chaque NTP et 1 U/μl de RNAsin) pendant 2 h à 37°C. Le plasmide est dégradé par addition de DNase dans le milieu et incubation de 20 min à 37°C. L'ARN est extrait par addition d'un volume de phénol/chloroforme (v:v) puis purifié par chromatographie liquide sur gel d'exclusion (colonne TSK G2000 ; *TOSOH*) dans le tampon 0,2 M d'acétate de Na pH 5,8 et 1% éthanol. La concentration en acétate de Na est ajustée à 0,3 M dans les fractions contenant l'ARN. L'ARN est précipité par addition de 3 vol d'éthanol froid, repris dans 20 μl d'eau mQ et la concentration évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm.

2. Marquage de l'extrémité 5' de l'amorce oligonucléotidique

1 μg d'amorce ADN est radio-marqué en 5' avec 60 μCi de γ-[³²P]ATP grâce à 1 U/μl d'enzyme T4 PolyNucléotide Kinase (PNK) (*Biolabs*) dans le tampon kinase (Tris-HCl 70 mM pH 7,6, MgCl2 10 mM, DTT 5 mM, spermidine 1 mM) pendant 30 min à 37°C. L'amorce est purifiée par électrophorèse sur gel polyacrylamide-urée dénaturant (10%-8M) par une migration de 1 h à 35 mA dans du tampon TBE (Tris 100 mM, Borate 100 mM, EDTA 2 mM). La sonde est éluée du gel dans l'eau mQ par incubation 3 min à 90°C puis 20 min à température ambiante. La sonde est précipitée par ajustement à 0,5 M d'acétate de NH₄, 0,1 mM d'EDTA et 3 vol d'éthanol froid pendant 20 min à -80°C. Après centrifugation 20 min à 13000 rpm et élimination du surnageant, le culot sec est repris dans 50 μl d'eau mQ. Le marquage de la sonde est évalué par comptage Cerenkov en coups par minute (cpm).

3. Transcription inverse

6 pmol d'ARN *PSD-219* et 100 000 cpm de sonde radio-marquée sont hybridés dans 6 μl de tampon d'hybridation (Hepes-Na 50 mM pH 7, EDTA 0,2 mM, KCl ou NaCl 100 mM) pendant 1 min à 90°C puis 5 min à température ambiante.

La réaction de réverse transcription est réalisée sur le duplex ARN/sonde avec 0,25 U/μl de transcriptase inverse AMV (*Appligene*) dans 15 μl de tampon d'extension (Tris-HCl 50 mM pH 8,3-37°C, MgCl₂ 6 mM, dNTP 350 μM chacun, KCl ou NaCl ou LiCl 40 mM) pendant 30 min à 37°C. En parallèle, le séquençage de l'ARN est réalisé afin d'identifier la position des arrêts de la réverse transcriptase représentant l'extrémité 3' d'un motif G-quartet. Les réactions de réverse transcription sur le duplex ARN/sonde, hybridés en présence d'ions Na⁺, sont réalisées en présence de 0,25 U/μl de transcriptase inverse AMV dans le tampon d'extension (Tris-HCl 50 mM pH 8,3-37°C, MgCl₂ 6 mM, dNTP 350 μM chacun, NaCl 40 mM) avec 3 μM de ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP dans chaque réaction de séquençage. Les ADNc sont précipités après ajustement à 0,3 M d'Acétate de Na et 3 vol d'éthanol 100% par incubation 20 min à -80°C et centrifugation à 13000 rpm pendant 20 min à 4°C. Les culots, lavés à l'éthanol 80% et séchés brièvement, sont repris dans 8 μl de tampon de dépôt (formamide 90%, bleus Xylène Cyanol et Bromophénol 0,05%). Les échantillons sont chauffés 5 min à 90°C puis les ADNc séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide-urée (8%-8M) pendant 2 h à 75 W dans du tampon TBE. Après fixation 15 min dans un bain

d'acide acétique (7,5%) méthanol (5%), le gel est séché sur papier Whatmann 3 MM à 80°C pendant 1 h puis mis en exposition avec un film autoradiographique XAR (*Kodak*).

BIBLIOGRAPHIE

- Abitbol, M., C. Menini, A.L. Delezoide, T. Rhyner, M. Vekemans, and J. Mallet. 1993. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet*. 4:147-53.
- Adinolfi, S., A. Ramos, S.R. Martin, F. Dal Piaz, P. Pucci, B. Bardoni, J.L. Mandel, and A. Pastore. 2003. The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry*. 42:10437-44.
- Akaaboune, M., B. Allinquant, H. Farza, K. Roy, R. Magoul, M. Fiszman, B.W. Festoff, and D. Hantai. 2000. Developmental regulation of amyloid precursor protein at the neuromuscular junction in mouse skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci*. 15:355-67.
- Alarcon, J.M., R. Hodgman, M. Theis, Y.S. Huang, E.R. Kandel, and J.D. Richter. 2004. Selective modulation of some forms of schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn Mem.* 11:318-27.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2002. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones*. 7:213-21.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. J Cell Biol. 172:803-8.
- Andrei, M.A., D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar, and R. Luhrmann. 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna.* 11:717-27.
- Antar, L.N., R. Afroz, J.B. Dictenberg, R.C. Carroll, and G.J. Bassell. 2004. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci*. 24:2648-55
- Antar, L.N., J.B. Dictenberg, M. Plociniak, R. Afroz, and G.J. Bassell. 2005. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav*. 4:350-9.
- Arora, A., M. Dutkiewicz, V. Scaria, M. Hariharan, S. Maiti, and J. Kurreck. 2008. Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *Rna*. 14:1290-6.
- Aschrafi, A., B.A. Cunningham, G.M. Edelman, and P.W. Vanderklish. 2005. The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:2180-5.
- Ashley, C.T., Jr., K.D. Wilkinson, D. Reines, and S.T. Warren. 1993a. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*. 262:563-6.
- Ashley, C.T., J.S. Sutcliffe, C.B. Kunst, H.A. Leiner, E.E. Eichler, D.L. Nelson, and S.T. Warren. 1993b. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*. 4:244-51.
- Ashraf, S.I., A.L. McLoon, S.M. Sclarsic, and S. Kunes. 2006. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in Drosophila. *Cell*. 124:191-205.
- Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, and A.E. Pasquinelli. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 122:553-63.
- Bakker, C.E., Y. de Diego Otero, C. Bontekoe, P. Raghoe, T. Luteijn, A.T. Hoogeveen, B.A. Oostra, and R. Willemsen. 2000. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res.* 258:162-70
- Banko, J.L., L. Hou, and E. Klann. 2004. NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J Neurochem*. 91:462-70.

- Bardoni, B., M. Castets, M.E. Huot, A. Schenck, S. Adinolfi, F. Corbin, A. Pastore, E.W. Khandjian, and J.L. Mandel. 2003a. 82-FIP, a novel FMRP (fragile X mental retardation protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization. *Hum Mol Genet*. 12:1689-98.
- Bardoni, B., and J.L. Mandel. 2002. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev.* 12:284-93.
- Bardoni, B., A. Sittler, Y. Shen, and J.L. Mandel. 1997. Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. *Neurobiol Dis.* 4:329-36.
- Bardoni, B., R. Willemsen, I.J. Weiler, A. Schenck, L.A. Severijnen, C. Hindelang, E. Lalli, and J.L. Mandel. 2003b. NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneurosomes. *Exp Cell Res.* 289:95-107.
- Bashkirov, V.I., H. Scherthan, J.A. Solinger, J.M. Buerstedde, and W.D. Heyer. 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol.* 136:761-73.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. Nature. 431:356-63.
- Bear, M.F., and R.C. Malenka. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*. 4:389-99.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde. 2006a. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20:1885-98.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, and E. Izaurralde. 2006b. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 71:523-30.
- Bhattacharyya, S.N., R. Habermacher, U. Martine, E.I. Closs, and W. Filipowicz. 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 125:1111-24.
- Bindewald, E., R. Hayes, Y.G. Yingling, W. Kasprzak, and B.A. Shapiro. 2008. RNAJunction: a database of RNA junctions and kissing loops for three-dimensional structural analysis and nanodesign. *Nucleic Acids Res.* 36:D392-7.
- Bliss, T.V., and G.L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361:31-9.
- Bliss, T.V., and A.R. Gardner-Medwin. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaestetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232:357-74.
- Bliss, T.V., and T. Lomo. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232:331-56.
- Bonnal, S., C. Schaeffer, L. Creancier, S. Clamens, H. Moine, A.C. Prats, and S. Vagner. 2003. A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem.* 278:39330-6.
- Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 310:486-9.
- Brennan, C.M., and J.A. Steitz. 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci.* 58:266-77. Brosius, J., and H. Tiedge. 2001. Neuronal BC1 RNA: intracellular transport and activity-dependent modulation. *Results Probl Cell Differ*. 34:129-38.
- Brown, V., P. Jin, S. Ceman, J.C. Darnell, W.T. O'Donnell, S.A. Tenenbaum, X. Jin, Y. Feng, K.D. Wilkinson, J.D. Keene, R.B. Darnell, and S.T. Warren. 2001. Microarray

- identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell.* 107:477-87.
- Brown, V., K. Small, L. Lakkis, Y. Feng, C. Gunter, K.D. Wilkinson, and S.T. Warren. 1998. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem.* 273:15521-7.
- Buchman, A.R., and P. Berg. 1988. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol.* 8:4395-405.
- Burd, C.G., and G. Dreyfuss. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 265:615-21.
- Butterfield, D.A., and D. Boyd-Kimball. 2005. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1703:149-56.
- Castets, M., C. Schaeffer, E. Bechara, A. Schenck, E.W. Khandjian, S. Luche, H. Moine, T. Rabilloud, J.L. Mandel, and B. Bardoni. 2005. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 14:835-44.
- Caudy, A.A., R.F. Ketting, S.M. Hammond, A.M. Denli, A.M. Bathoorn, B.B. Tops, J.M. Silva, M.M. Myers, G.J. Hannon, and R.H. Plasterk. 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*. 425:411-4.
- Caudy, A.A., M. Myers, G.J. Hannon, and S.M. Hammond. 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16:2491-6.
- Ceman, S., V. Brown, and S.T. Warren. 1999. Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol*. 19:7925-32.
- Ceman, S., R. Nelson, and S.T. Warren. 2000. Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochem Biophys Res Commun*. 279:904-8.
- Ceman, S., W.T. O'Donnell, M. Reed, S. Patton, J. Pohl, and S.T. Warren. 2003. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 12:3295-305.
- Chang, S., S.M. Bray, Z. Li, D.C. Zarnescu, C. He, P. Jin, and S.T. Warren. 2008. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in Drosophila. *Nat Chem Biol*. 4:256-63.
- Chelly, J. 2000. [Recent advances in the genetics and physiopathology of X chromosomal mental retardation]. *Arch Pediatr*. 7 Suppl 2:114s-118s.
- Chelly, J., and J.L. Mandel. 2001. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*. 2:669-80.
- Chelsky, D., R. Ralph, and G. Jonak. 1989. Sequence requirements for synthetic peptidemediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*. 9:2487-92.
- Chen, L., and M. Toth. 2001. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience*. 103:1043-50.
- Chiurazzi, P., M.G. Pomponi, R. Pietrobono, C.E. Bakker, G. Neri, and B.A. Oostra. 1999. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 8:2317-23.
- Chiurazzi, P., M.G. Pomponi, R. Willemsen, B.A. Oostra, and G. Neri. 1998. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 7:109-13
- Chiurazzi, P., C.E. Schwartz, J. Gecz, and G. Neri. 2008. XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet*.

- Chowdhury, S., J.D. Shepherd, H. Okuno, G. Lyford, R.S. Petralia, N. Plath, D. Kuhl, R.L. Huganir, and P.F. Worley. 2006. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 52:445-59.
- Christiansen, J., M. Kofod, and F.C. Nielsen. 1994. A guanosine quadruplex and two stable hairpins flank a major cleavage site in insulin-like growth factor II mRNA. *Nucleic Acids Res.* 22:5709-16.
- Chu, C.Y., and T.M. Rana. 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*. 4:e210.
- Chuang, S.C., W. Zhao, R. Bauchwitz, Q. Yan, R. Bianchi, and R.K. Wong. 2005. Prolonged epileptiform discharges induced by altered group I metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model. *J Neurosci.* 25:8048-55.
- Coffee, B., F. Zhang, S. Ceman, S.T. Warren, and D. Reines. 2002. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. *Am J Hum Genet*. 71:923-32.
- Coffee, B., F. Zhang, S.T. Warren, and D. Reines. 1999. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet*. 22:98-101.
- Coller, J., and R. Parker. 2004. Eukaryotic mRNA decapping. Annu Rev Biochem. 73:861-90.
- Comery, T.A., J.B. Harris, P.J. Willems, B.A. Oostra, S.A. Irwin, I.J. Weiler, and W.T. Greenough. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5401-4.
- Corbin, F., M. Bouillon, A. Fortin, S. Morin, F. Rousseau, and E.W. Khandjian. 1997. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet*. 6:1465-72.
- Costa-Mattioli, M., D. Gobert, E. Stern, K. Gamache, R. Colina, C. Cuello, W. Sossin, R. Kaufman, J. Pelletier, K. Rosenblum, K. Krnjevic, J.C. Lacaille, K. Nader, and N. Sonenberg. 2007. eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 129:195-206.
- Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*. 165:31-40.
- D'Hulst, C., N. De Geest, S.P. Reeve, D. Van Dam, P.P. De Deyn, B.A. Hassan, and R.F. Kooy. 2006. Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res.* 1121:238-45.
- Daigle, N., and J. Ellenberg. 2007. LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods*. 4:633-6.
- Dang, Y., N. Kedersha, W.K. Low, D. Romo, M. Gorospe, R. Kaufman, P. Anderson, and J.O. Liu. 2006. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J Biol Chem.* 281:32870-8.
- Darnell, J.C., C.E. Fraser, O. Mostovetsky, G. Stefani, T.A. Jones, S.R. Eddy, and R.B. Darnell. 2005a. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev.* 19:903-18
- Darnell, J.C., K.B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S.T. Warren, and R.B. Darnell. 2001. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell.* 107:489-99.
- Darnell, J.C., O. Mostovetsky, and R.B. Darnell. 2005b. FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes Brain Behav*. 4:341-9.
- Davidkova, G., and R.C. Carroll. 2007. Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci.* 27:13273-8.

- Davidovic, L., E. Bechara, M. Gravel, X.H. Jaglin, S. Tremblay, A. Sik, B. Bardoni, and E.W. Khandjian. 2006. The nuclear microspherule protein 58 is a novel RNA-binding protein that interacts with fragile X mental retardation protein in polyribosomal mRNPs from neurons. *Hum Mol Genet*. 15:1525-38.
- Davidovic, L., X.H. Jaglin, A.M. Lepagnol-Bestel, S. Tremblay, M. Simonneau, B. Bardoni, and E.W. Khandjian. 2007. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet*. 16:3047-58.
- De Boulle, K., A.J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van den Bos, E. de Graaff, B.A. Oostra, and P.J. Willems. 1993. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*. 3:31-5.
- De Cian, A., and J.L. Mergny. 2007. Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation. *Nucleic Acids Res.* 35:2483-93.
- De Diego Otero, Y., C.E. Bakker, P. Raghoe, L.-A. Severijnen, A. Hoogeveen, O. B., and R. Willemsen. 2000. Immunocytochemical characterization of FMRP, FXR1P and FXR2P during embryonic development in the mouse. *Gene Function and desease*. 1:28-37.
- De Diego Otero, Y., L.A. Severijnen, G. van Cappellen, M. Schrier, B. Oostra, and R. Willemsen. 2002. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol*. 22:8332-41.
- de Haro, C., R. Mendez, and J. Santoyo. 1996. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *Faseb J.* 10:1378-87.
- de Vrij, F.M., J. Levenga, H.C. van der Linde, S.K. Koekkoek, C.I. De Zeeuw, D.L. Nelson, B.A. Oostra, and R. Willemsen. 2008. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. *Neurobiol Dis.* 31:127-32.
- Denman, R.B. 2002. Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell Mol Biol Lett.* 7:877-83.
- Denman, R.B., N. Dolzhanskaya, and Y.J. Sung. 2004. Regulating a translational regulator: mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. *Cell Mol Life Sci.* 61:1714-28.
- Dever, T.E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. Cell. 108:545-56.
- Devys, D., Y. Lutz, N. Rouyer, J.P. Bellocq, and J.L. Mandel. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*. 4:335-40.
- Dictenberg, J.B., S.A. Swanger, L.N. Antar, R.H. Singer, and G.J. Bassell. 2008. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell*. 14:926-39.
- Didiot, M.C., Z. Tian, C. Schaeffer, M. Subramanian, J.L. Mandel, and H. Moine. 2008. The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucleic Acids Res*.
- Dockendorff, T.C., H.S. Su, S.M. McBride, Z. Yang, C.H. Choi, K.K. Siwicki, A. Sehgal, and T.A. Jongens. 2002. Drosophila lacking dfmr1 activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron*. 34:973-84.
- Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17:438-42.
- Dolen, G., and M.F. Bear. 2008. Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *J Physiol*. 586:1503-8.

- Dolzhanskaya, N., D.C. Bolton, and R.B. Denman. 2008. Chemical and structural probing of the N-terminal residues encoded by FMR1 exon 15 and their effect on downstream arginine methylation. *Biochemistry*. 47:8491-503.
- Dolzhanskaya, N., G. Merz, J.M. Aletta, and R.B. Denman. 2006a. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J Cell Sci.* 119:1933-46.
- Dolzhanskaya, N., G. Merz, and R.B. Denman. 2006b. Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry*. 45:10385-93.
- Dunaevsky, A., A. Tashiro, A. Majewska, C. Mason, and R. Yuste. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13438-43.
- Eberhart, D.E., H.E. Malter, Y. Feng, and S.T. Warren. 1996. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*. 5:1083-91.
- Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 418:790-3
- Eichler, E.E., S. Richards, R.A. Gibbs, and D.L. Nelson. 1993. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 2:1147-53.
- el Bekay, R., Y. Romero-Zerbo, J. Decara, L. Sanchez-Salido, I. Del Arco-Herrera, F. Rodriguez-de Fonseca, and Y. de Diego-Otero. 2007. Enhanced markers of oxidative stress, altered antioxidants and NADPH-oxidase activation in brains from Fragile X mental retardation 1-deficient mice, a pathological model for Fragile X syndrome. *Eur J Neurosci*. 26:3169-80.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Elvira, G., S. Wasiak, V. Blandford, X.K. Tong, A. Serrano, X. Fan, M. del Rayo Sanchez-Carbente, F. Servant, A.W. Bell, D. Boismenu, J.C. Lacaille, P.S. McPherson, L. DesGroseillers, and W.S. Sossin. 2006. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics*. 5:635-51.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde. 2007. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. 27:3970-81.
- Feng, Y., D. Absher, D.E. Eberhart, V. Brown, H.E. Malter, and S.T. Warren. 1997a. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*. 1:109-18.
- Feng, Y., C.A. Gutekunst, D.E. Eberhart, H. Yi, S.T. Warren, and S.M. Hersch. 1997b. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci.* 17:1539-47.
- Fonnum, F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem. 42:1-11.
- Francesconi, W., M. Cammalleri, and P.P. Sanna. 2004. The metabotropic glutamate receptor 5 is necessary for late-phase long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 1022:12-8.
- Franke, P., M. Leboyer, M. Gansicke, O. Weiffenbach, V. Biancalana, P. Cornillet-Lefebre, M.F. Croquette, U. Froster, S.G. Schwab, F. Poustka, M. Hautzinger, and W. Maier. 1998. Genotype-phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR-1. *Psychiatry Res.* 80:113-27.
- Freund, L.S., A.L. Reiss, and M.T. Abrams. 1993. Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics*. 91:321-9.

- Fu, Y.H., D.P. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J.S. Sutcliffe, S. Richards, A.J. Verkerk, J.J. Holden, R.G. Fenwick, Jr., S.T. Warren, and et al. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 67:1047-58.
- Gantois, I., J. Vandesompele, F. Speleman, E. Reyniers, R. D'Hooge, L.A. Severijnen, R. Willemsen, F. Tassone, and R.F. Kooy. 2006. Expression profiling suggests underexpression of the GABA(A) receptor subunit delta in the fragile X knockout mouse model. *Neurobiol Dis.* 21:346-57.
- Gebauer, F., and M.W. Hentze. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:827-35.
- Gedeon, A.K., E. Baker, H. Robinson, M.W. Partington, B. Gross, A. Manca, B. Korn, A. Poustka, S. Yu, G.R. Sutherland, and et al. 1992. Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet*. 1:341-4.
- Gingras, A.C., S.P. Gygi, B. Raught, R.D. Polakiewicz, R.T. Abraham, M.F. Hoekstra, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 13:1422-37.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J.* 17:1476-86.
- Giraldez, A.J., Y. Mishima, J. Rihel, R.J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A.J. Enright, and A.F. Schier. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*. 312:75-9.
- Giuffrida, R., S. Musumeci, S. D'Antoni, C.M. Bonaccorso, A.M. Giuffrida-Stella, B.A. Oostra, and M.V. Catania. 2005. A reduced number of metabotropic glutamate subtype 5 receptors are associated with constitutive homer proteins in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*. 25:8908-16.
- Godfraind, J.M., E. Reyniers, K. De Boulle, R. D'Hooge, P.P. De Deyn, C.E. Bakker, B.A. Oostra, R.F. Kooy, and P.J. Willems. 1996. Long-term potentiation in the hippocampus of fragile X knockout mice. *Am J Med Genet*. 64:246-51.
- Goldstein, L.S., and Z. Yang. 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci*. 23:39-71.
- Gomez, D., T. Lemarteleur, L. Lacroix, P. Mailliet, J.L. Mergny, and J.F. Riou. 2004. Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 32:371-9.
- Gray, N.K., and M.W. Hentze. 1994. Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *Embo J.* 13:3882-91
- Greenough, W.T., A.Y. Klintsova, S.A. Irwin, R. Galvez, K.E. Bates, and I.J. Weiler. 2001. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7101-6.
- Grossman, A.W., N.M. Elisseou, B.C. McKinney, and W.T. Greenough. 2006. Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* 1084:158-64.
- Hagerman, P.J., and R.J. Hagerman. 2004. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10:25-30.
- Hagerman, R.J. 1987. Fragile X syndrome. Curr Probl Pediatr. 17:621-74.
- Hagerman, R.J., D. Altshul-Stark, and P. McBogg. 1987. Recurrent otitis media in the fragile X syndrome. *Am J Dis Child*. 141:184-7.
- Hagerman, R.J., A.W. Jackson, 3rd, A. Levitas, B. Rimland, and M. Braden. 1986. An analysis of autism in fifty males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 23:359-74.

- Hagerman, R.J., K. Van Housen, A.C. Smith, and L. McGavran. 1984. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 17:111-21.
- Hagerman, R.J.a.A.C. 1996. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research. *Baltimore, John Hopkins University Press.*
- Hagerman, R.J.a.P.J.H. 2002. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research. *Baltimore, John Hopkins University Press.*
- Hebb. 1949. The Organization of Behavior. John Wiley: New York.
- Hellen, C.U., and P. Sarnow. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15:1593-612.
- Hering, H., and M. Sheng. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2:880-8.
- Hinds, H.L., C.T. Ashley, J.S. Sutcliffe, D.L. Nelson, S.T. Warren, D.E. Housman, and M. Schalling. 1993. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet*. 3:36-43.
- Hinnebusch, A.G., K. Asano, D.S. Olsen, L. Phan, K.H. Nielsen, and L. Valasek. 2004. Study of translational control of eukaryotic gene expression using yeast. *Ann N Y Acad Sci*. 1038:60-74.
- Hinton, V.J., W.T. Brown, K. Wisniewski, and R.D. Rudelli. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 41:289-94.
- Holcik, M., and N. Sonenberg. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:318-27.
- Horsburgh, B.C., H. Kollmus, H. Hauser, and D.M. Coen. 1996. Translational recoding induced by G-rich mRNA sequences that form unusual structures. *Cell*. 86:949-59.
- Hou, L., M.D. Antion, D. Hu, C.M. Spencer, R. Paylor, and E. Klann. 2006. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron.* 51:441-54.
- Hua, Y., and J. Zhou. 2004. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett.* 572:69-74.
- Huang, Y.S., J.H. Carson, E. Barbarese, and J.D. Richter. 2003. Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev.* 17:638-53.
- Huang, Y.S., M.Y. Jung, M. Sarkissian, and J.D. Richter. 2002. N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *Embo J.* 21:2139-48.
- Huber, K.M., S.M. Gallagher, S.T. Warren, and M.F. Bear. 2002. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7746-50
- Huber, K.M., M.S. Kayser, and M.F. Bear. 2000. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*. 288:1254-7.
- Humphreys, D.T., B.J. Westman, D.I. Martin, and T. Preiss. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16961-6.
- Iacoangeli, A., T.S. Rozhdestvensky, N. Dolzhanskaya, B. Tournier, J. Schutt, J. Brosius, R.B. Denman, E.W. Khandjian, S. Kindler, and H. Tiedge. 2008. On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:734-9.
- Ingelfinger, D., D.J. Arndt-Jovin, R. Luhrmann, and T. Achsel. 2002. The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *Rna*. 8:1489-501.
- Irwin, S.A., R. Galvez, and W.T. Greenough. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*. 10:1038-44.

- Ishizuka, A., M.C. Siomi, and H. Siomi. 2002. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 16:2497-508.
- Ito, M. 2001. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev.* 81:1143-95.
- Jakymiw, A., S. Lian, T. Eystathioy, S. Li, M. Satoh, J.C. Hamel, M.J. Fritzler, and E.K. Chan. 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*. 7:1267-74.
- Jin, P., R.S. Alisch, and S.T. Warren. 2004. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol*. 6:1048-53.
- Jin, P., D.C. Zarnescu, F. Zhang, C.E. Pearson, J.C. Lucchesi, K. Moses, and S.T. Warren. 2003. RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in Drosophila. *Neuron*. 39:739-47.
- Jing, Q., S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. Di Padova, S.C. Lin, H. Gram, and J. Han. 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 120:623-34.
- Johannes, G., M.S. Carter, M.B. Eisen, P.O. Brown, and P. Sarnow. 1999. Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13118-23.
- Johannes, G., and P. Sarnow. 1998. Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *Rna*. 4:1500-13.
- Johnstone, O., and P. Lasko. 2001. Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos. *Annu Rev Genet*. 35:365-406.
- Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*. 43:513-25.
- Kapsimali, M., W.P. Kloosterman, E. de Bruijn, F. Rosa, R.H. Plasterk, and S.W. Wilson. 2007. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* 8:R173.
- Kaufmann, W.E., R. Cortell, A.S. Kau, I. Bukelis, E. Tierney, R.M. Gray, C. Cox, G.T. Capone, and P. Stanard. 2004. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. *Am J Med Genet A*. 129A:225-34.
- Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I.J. Miller, J. Stahl, and P. Anderson. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell*. 13:195-210.
- Kedersha, N., M.R. Cho, W. Li, P.W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D.E. Golan, and P. Anderson. 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol.* 151:1257-68.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fritzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, and P. Anderson. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 169:871-84.
- Kedersha, N.L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 147:1431-42.
- Kelleher, R.J., 3rd, A. Govindarajan, H.Y. Jung, H. Kang, and S. Tonegawa. 2004. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell.* 116:467-79.

- Kelly, A., and M.A. Lynch. 2000. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology*. 39:643-51.
- Khandjian, E.W., F. Corbin, S. Woerly, and F. Rousseau. 1996. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet*. 12:91-3.
- Khandjian, E.W., A. Fortin, A. Thibodeau, S. Tremblay, F. Cote, D. Devys, J.L. Mandel, and F. Rousseau. 1995. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet*. 4:783-9.
- Kiledjian, M., and G. Dreyfuss. 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J.* 11:2655-64.
- Kim, E., and M. Sheng. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*. 5:771-81.
- Kim, S., G.H. Park, and W.K. Paik. 1998. Recent advances in protein methylation: enzymatic methylation of nucleic acid binding proteins. *Amino Acids*. 15:291-306.
- Kim, W.J., S.H. Back, V. Kim, I. Ryu, and S.K. Jang. 2005. Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. *Mol Cell Biol.* 25:2450-62.
- Kimball, S.R., R.L. Horetsky, D. Ron, L.S. Jefferson, and H.P. Harding. 2003. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284:C273-84.
- Klann, E., and T.E. Dever. 2004. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 5:931-42.
- Knight, S.W., and B.L. Bass. 2002. The role of RNA editing by ADARs in RNAi. *Mol Cell*. 10:809-17.
- Kobayashi, K., S. Kuroda, M. Fukata, T. Nakamura, T. Nagase, N. Nomura, Y. Matsuura, N. Yoshida-Kubomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem.* 273:291-5.
- Kobayashi, S., K. Agui, S. Kamo, Y. Li, and K. Anzai. 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.* 277:341-7.
- Kohno, K., H. Izumi, T. Uchiumi, M. Ashizuka, and M. Kuwano. 2003. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*. 25:691-8.
- Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C.G. Dotti, and M.A. Kiebler. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell*. 10:2945-53.
- Kolb, S.J., D.J. Battle, and G. Dreyfuss. 2007. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol*. 22:990-4.
- Kooy, R.F., R. D'Hooge, E. Reyniers, C.E. Bakker, G. Nagels, K. De Boulle, K. Storm, G. Clincke, P.P. De Deyn, B.A. Oostra, and P.J. Willems. 1996. Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 64:241-5.
- Kooy, R.F., E. Reyniers, M. Verhoye, J. Sijbers, C.E. Bakker, B.A. Oostra, P.J. Willems, and A. Van Der Linden. 1999. Neuroanatomy of the fragile X knockout mouse brain studied using in vivo high resolution magnetic resonance imaging. *Eur J Hum Genet*. 7:526-32.
- Kostadinov, R., N. Malhotra, M. Viotti, R. Shine, L. D'Antonio, and P. Bagga. 2006. GRSDB: a database of quadruplex forming G-rich sequences in alternatively processed mammalian pre-mRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 34:D119-24.

- Krawczun, M.S., E.C. Jenkins, and W.T. Brown. 1985. Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum Genet*. 69:209-11.
- Kremer, E.J., M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S.T. Warren, D. Schlessinger, G.R. Sutherland, and R.I. Richards. 1991. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science*. 252:1711-4.
- Kunda, P., G. Craig, V. Dominguez, and B. Baum. 2003. Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol.* 13:1867-75.
- Kunst, C.B., and S.T. Warren. 1994. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* 77:853-61.
- Lachiewicz, A.M., and D.V. Dawson. 1994. Do young boys with fragile X syndrome have macroorchidism? *Pediatrics*. 93:992-5.
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, E.M. Keidel, A. Ostareck-Lederer, and U. Fischer. 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet*. 10:329-38.
- Lal, A., T. Kawai, X. Yang, K. Mazan-Mamczarz, and M. Gorospe. 2005. Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *Embo J.* 24:1852-62.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C.E. Rogler, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 129:1401-14.
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science*. 294:858-62.
- Leatherman, J.L., and T.A. Jongens. 2003. Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. *Bioessays*. 25:326-35.
- Leipuviene, R., and E.C. Theil. 2007. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen. *Cell Mol Life Sci.* 64:2945-55.
- Li, J., M.R. Pelletier, J.L. Perez Velazquez, and P.L. Carlen. 2002. Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency. *Mol Cell Neurosci*. 19:138-51.
- Li, Y., K. Koike, S. Ohashi, T. Funakoshi, M. Tadano, S. Kobayashi, K. Anzai, N. Shibata, and M. Kobayashi. 2001a. Pur alpha protein implicated in dendritic RNA transport interacts with ribosomes in neuronal cytoplasm. *Biol Pharm Bull*. 24:231-5.
- Li, Z., Y. Zhang, L. Ku, K.D. Wilkinson, S.T. Warren, and Y. Feng. 2001b. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 29:2276-83.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, and J.M. Johnson. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433:769-73.
- Linder, B., O. Plottner, M. Kroiss, E. Hartmann, B. Laggerbauer, G. Meister, E. Keidel, and U. Fischer. 2008. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet*.

- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde, and M. Sattler. 2003. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*. 426:465-9.
- Liu, J., F.V. Rivas, J. Wohlschlegel, J.R. Yates, 3rd, R. Parker, and G.J. Hannon. 2005a. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*. 7:1261-6.
- Liu, J., M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon, and R. Parker. 2005b. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 7:719-23.
- Llave, C., Z. Xie, K.D. Kasschau, and J.C. Carrington. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. 297:2053-6.
- Lu, R., H. Wang, Z. Liang, L. Ku, T. O'Donnell W, W. Li, S.T. Warren, and Y. Feng. 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*. 101:15201-6.
- Lu, Y.M., Z. Jia, C. Janus, J.T. Henderson, R. Gerlai, J.M. Wojtowicz, and J.C. Roder. 1997. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci.* 17:5196-205.
- Lugenbeel, K.A., A.M. Peier, N.L. Carson, A.E. Chudley, and D.L. Nelson. 1995. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat Genet*. 10:483-5.
- Lugli, G., J. Larson, M.E. Martone, Y. Jones, and N.R. Smalheiser. 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.* 94:896-905.
- Lynch, G., M. Kessler, S. Halpain, and M. Baudry. 1983. Biochemical effects of high-frequency synaptic activity studied with in vitro slices. *Fed Proc.* 42:2886-90.
- Ma, J.B., Y.R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl, and D.J. Patel. 2005. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature*. 434:666-70.
- Maroney, P.A., Y. Yu, J. Fisher, and T.W. Nilsen. 2006. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 13:1102-7.
- Martinez, J., and T. Tuschl. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18:975-80.
- Mathews, M.B. 2002. Lost in translation. *Trends Biochem Sci.* 27:267-9.
- Matus, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. Science. 290:754-8.
- Maurer-Stroh, S., N.J. Dickens, L. Hughes-Davies, T. Kouzarides, F. Eisenhaber, and C.P. Ponting. 2003. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci.* 28:69-74.
- Mazroui, R., M.E. Huot, S. Tremblay, C. Filion, Y. Labelle, and E.W. Khandjian. 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet*. 11:3007-17.
- Mazroui, R., R. Sukarieh, M.E. Bordeleau, R.J. Kaufman, P. Northcote, J. Tanaka, I. Gallouzi, and J. Pelletier. 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 17:4212-9.
- McBride, S.M., C.H. Choi, Y. Wang, D. Liebelt, E. Braunstein, D. Ferreiro, A. Sehgal, K.K. Siwicki, T.C. Dockendorff, H.T. Nguyen, T.V. McDonald, and T.A. Jongens. 2005. Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of fragile X syndrome. *Neuron*. 45:753-64.
- McKinney, R.A. 2005. Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. *Biochem Soc Trans*. 33:1299-302.

- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 15:185-97.
- Mergny, J.L., and C. Helene. 1998. G-quadruplex DNA: a target for drug design. *Nat Med*. 4:1366-7.
- Mientjes, E.J., I. Nieuwenhuizen, L. Kirkpatrick, T. Zu, M. Hoogeveen-Westerveld, L. Severijnen, M. Rife, R. Willemsen, D.L. Nelson, and B.A. Oostra. 2006. The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol Dis.* 21:549-55.
- Miyashiro, K.Y., A. Beckel-Mitchener, T.P. Purk, K.G. Becker, T. Barret, L. Liu, S. Carbonetto, I.J. Weiler, W.T. Greenough, and J. Eberwine. 2003. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron*. 37:417-31.
- Miyoshi, K., H. Tsukumo, T. Nagami, H. Siomi, and M.C. Siomi. 2005. Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* 19:2837-48
- Montgomery, J.M., P.L. Zamorano, and C.C. Garner. 2004. MAGUKs in synapse assembly and function: an emerging view. *Cell Mol Life Sci.* 61:911-29.
- Moog, U. 2005. The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. *Am J Med Genet A*. 137:228-31.
- Morales, J., P.R. Hiesinger, A.J. Schroeder, K. Kume, P. Verstreken, F.R. Jackson, D.L. Nelson, and B.A. Hassan. 2002. Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron*. 34:961-72.
- Morris, R.G., E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 319:774-6.
- Muckenthaler, M., N.K. Gray, and M.W. Hentze. 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*. 2:383-8.
- Muddashetty, R.S., S. Kelic, C. Gross, M. Xu, and G.J. Bassell. 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*. 27:5338-48.
- Murray, A., S. Youings, N. Dennis, L. Latsky, P. Linehan, N. McKechnie, J. Macpherson, M. Pound, and P. Jacobs. 1996. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet*. 5:727-35.
- Musco, G., G. Stier, C. Joseph, M.A. Castiglione Morelli, M. Nilges, T.J. Gibson, and A. Pastore. 1996. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. 85:237-45.
- Musumeci, S.A., P. Bosco, G. Calabrese, C. Bakker, G.B. De Sarro, M. Elia, R. Ferri, and B.A. Oostra. 2000. Audiogenic seizures susceptibility in transgenic mice with fragile X syndrome. *Epilepsia*. 41:19-23.
- Musumeci, S.A., R.J. Hagerman, R. Ferri, P. Bosco, B. Dalla Bernardina, C.A. Tassinari, G.B. De Sarro, and M. Elia. 1999. Epilepsy and EEG findings in males with fragile X syndrome. *Epilepsia*. 40:1092-9.
- Najbauer, J., and D.W. Aswad. 1990. Diversity of methyl acceptor proteins in rat pheochromocytoma (PC12) cells revealed after treatment with adenosine dialdehyde. *J Biol Chem.* 265:12717-21.

- Nakamoto, M., V. Nalavadi, M.P. Epstein, U. Narayanan, G.J. Bassell, and S.T. Warren. 2007. Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:15537-42.
- Nakamura, A., K. Sato, and K. Hanyu-Nakamura. 2004. Drosophila cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev Cell*. 6:69-78.
- Nakayama, A.Y., M.B. Harms, and L. Luo. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 20:5329-38.
- Narayanan, U., V. Nalavadi, M. Nakamoto, D.C. Pallas, S. Ceman, G.J. Bassell, and S.T. Warren. 2007. FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci.* 27:14349-57.
- Narayanan, U., V. Nalavadi, M. Nakamoto, G. Thomas, S. Ceman, G.J. Bassell, and S.T. Warren. 2008. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem.* 283:18478-82.
- Nelson, M.R., A.M. Leidal, and C.A. Smibert. 2004. Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *Embo J.* 23:150-9.
- Nosyreva, E.D., and K.M. Huber. 2006. Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol*. 95:3291-5.
- Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 13:1108-14.
- Nover, L., K.D. Scharf, and D. Neumann. 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol.* 9:1298-308.
- Oberle, I., F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boue, M. Bertheas, and J. Mandel. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 252:1097-1102.
- Ogawa, F., M. Kasai, and T. Akiyama. 2005. A functional link between Disrupted-In-Schizophrenia 1 and the eukaryotic translation initiation factor 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:771-6.
- Ohashi, S., S. Kobayashi, A. Omori, S. Ohara, A. Omae, T. Muramatsu, Y. Li, and K. Anzai. 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.* 75:1781-90.
- Ohashi, S., K. Koike, A. Omori, S. Ichinose, S. Ohara, S. Kobayashi, T.A. Sato, and K. Anzai. 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.* 277:37804-10.
- Olsen, P.H., and V. Ambros. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 216:671-80.
- Opazo, P., A.M. Watabe, S.G. Grant, and T.J. O'Dell. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the induction of long-term potentiation through extracellular signal-related kinase-independent mechanisms. *J Neurosci.* 23:3679-88.
- Ostroff, L.E., J.C. Fiala, B. Allwardt, and K.M. Harris. 2002. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*. 35:535-45.

- Ozawa, S., H. Kamiya, and K. Tsuzuki. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 54:581-618.
- Paillart, J.C., R. Marquet, E. Skripkin, C. Ehresmann, and B. Ehresmann. 1996. Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie*. 78:639-53.
- Paradee, W., H.E. Melikian, D.L. Rasmussen, A. Kenneson, P.J. Conn, and S.T. Warren. 1999. Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*. 94:185-92.
- Park, S., J.M. Park, S. Kim, J.A. Kim, J.D. Shepherd, C.L. Smith-Hicks, S. Chowdhury, W. Kaufmann, D. Kuhl, A.G. Ryazanov, R.L. Huganir, D.J. Linden, and P.F. Worley. 2008. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron*. 59:70-83.
- Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford. 2004. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J.* 23:4727-37.
- Parnass, Z., A. Tashiro, and R. Yuste. 2000. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*. 10:561-8.
- Pause, A., G.J. Belsham, A.C. Gingras, O. Donze, T.A. Lin, J.C. Lawrence, Jr., and N. Sonenberg. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 371:762-7.
- Pavlov. 1927. Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex. *Oxford University Press: London.*
- Petersen, C.P., M.E. Bordeleau, J. Pelletier, and P.A. Sharp. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 21:533-42.
- Piazzon, N., F. Rage, F. Schlotter, H. Moine, C. Branlant, and S. Massenet. 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.* 283:5598-610.
- Pietrobono, R., M.G. Pomponi, E. Tabolacci, B. Oostra, P. Chiurazzi, and G. Neri. 2002. Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* 30:3278-85.
- Pillai, R.S., C.G. Artus, and W. Filipowicz. 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna.* 10:1518-25.
- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 309:1573-6.
- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 17:118-26.
- Price, D.K., F. Zhang, C.T. Ashley, Jr., and S.T. Warren. 1996. The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CCT 5'-untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. *Genomics*. 31:3-12.
- Rackham, O., and C.M. Brown. 2004. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *Embo J.* 23:3346-55.
- Rand, T.A., K. Ginalski, N.V. Grishin, and X. Wang. 2004. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14385-9.
- Rao, A., and O. Steward. 1991. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J Neurosci*. 11:2881-95.

- Raught, B., A.C. Gingras, S.P. Gygi, H. Imataka, S. Morino, A. Gradi, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2000. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *Embo J.* 19:434-44.
- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, D. Gatfield, and E. Izaurralde. 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna*. 11:1640-7.
- Reiss, A.L., E. Aylward, L.S. Freund, P.K. Joshi, and R.N. Bryan. 1991. Neuroanatomy of fragile X syndrome: the posterior fossa. *Ann Neurol*. 29:26-32.
- Reiss, A.L., J. Lee, and L. Freund. 1994. Neuroanatomy of fragile X syndrome: the temporal lobe. *Neurology*. 44:1317-24.
- Richter, J.D., and N. Sonenberg. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 433:477-80.
- Roegiers, F., and Y.N. Jan. 2000. Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons? *Trends Cell Biol*. 10:220-4.
- Ronesi, J.A., and K.M. Huber. 2008. Homer interactions are necessary for metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression and translational activation. *J Neurosci.* 28:543-7.
- Rook, M.S., M. Lu, and K.S. Kosik. 2000. CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci*. 20:6385-93.
- Ropers, H.H., and B.C. Hamel. 2005. X-linked mental retardation. Nat Rev Genet. 6:46-57.
- Rousseau, F., D. Heitz, I. Oberle, and J.L. Mandel. 1991. Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation. *J Med Genet*. 28:830-6.
- Rowlands, A.G., R. Panniers, and E.C. Henshaw. 1988. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* 263:5526-33.
- Scadden, A.D. 2005. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*. 12:489-96.
- Schaeffer, C., B. Bardoni, J.L. Mandel, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and H. Moine. 2001. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *Embo J.* 20:4803-13.
- Schenck, A., B. Bardoni, C. Langmann, N. Harden, J.L. Mandel, and A. Giangrande. 2003. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in Drosophila and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron*. 38:887-98.
- Schenck, A., B. Bardoni, A. Moro, C. Bagni, and J.L. Mandel. 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*. 98:8844-9.
- Schenck, A., A. Qurashi, P. Carrera, B. Bardoni, C. Diebold, E. Schejter, J.L. Mandel, and A. Giangrande. 2004. WAVE/SCAR, a multifunctional complex coordinating different aspects of neuronal connectivity. *Dev Biol.* 274:260-70.
- Schenck, A., V. Van de Bor, B. Bardoni, and A. Giangrande. 2002. Novel features of dFMR1, the Drosophila orthologue of the fragile X mental retardation protein. *Neurobiol Dis*. 11:53-63.
- Schisa, J.A., J.N. Pitt, and J.R. Priess. 2001. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of C. elegans adults. *Development*. 128:1287-98.
- Schratt, G.M., F. Tuebing, E.A. Nigh, C.G. Kane, M.E. Sabatini, M. Kiebler, and M.E. Greenberg. 2006. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 439:283-9.

- Schwarz, D.S., Y. Tomari, and P.D. Zamore. 2004. The RNA-induced silencing complex is a Mg2+-dependent endonuclease. *Curr Biol*. 14:787-91.
- Segal, M., V. Greenberger, and E. Korkotian. 2003. Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur J Neurosci*. 17:2573-85.
- Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss. 2002. Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol.* 243:215-25.
- Selbach, M., B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*.
- Selby, L., C. Zhang, and Q.Q. Sun. 2007. Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett.* 412:227-32.
- Sen, G.L., and H.M. Blau. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*. 7:633-6.
- Sherman, S.L. 2000. Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect? *Am J Hum Genet*. 67:11-3.
- Sherman, S.L., P.A. Jacobs, N.E. Morton, U. Froster-Iskenius, P.N. Howard-Peebles, K.B. Nielsen, M.W. Partington, G.R. Sutherland, G. Turner, and M. Watson. 1985. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet*. 69:289-99.
- Sheth, U., and R. Parker. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300:805-8.
- Siomi, H., M. Choi, M.C. Siomi, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 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*. 77:33-9.
- Siomi, H., M.J. Matunis, W.M. Michael, and G. Dreyfuss. 1993a. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21:1193-8.
- Siomi, H., M.C. Siomi, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 1993b. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*. 74:291-8.
- Siomi, M.C., K. Higashijima, A. Ishizuka, and H. Siomi. 2002. Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol*. 22:8438-47.
- Siomi, M.C., H. Siomi, W.H. Sauer, S. Srinivasan, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 1995. FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *Embo J.* 14:2401-8.
- Sittler, A., D. Devys, C. Weber, and J.L. Mandel. 1996. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet*. 5:95-102.
- Smeets, H.J., A.P. Smits, C.E. Verheij, J.P. Theelen, R. Willemsen, I. van de Burgt, A.T. Hoogeveen, J.C. Oosterwijk, and B.A. Oostra. 1995. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet*. 4:2103-8.
- Song, J.J., J. Liu, N.H. Tolia, J. Schneiderman, S.K. Smith, R.A. Martienssen, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor. 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol.* 10:1026-32.
- Song, J.J., S.K. Smith, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 305:1434-7.
- Sontheimer, E.J. 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:127-38.
- Spencer, C.M., E. Serysheva, L.A. Yuva-Paylor, B.A. Oostra, D.L. Nelson, and R. Paylor. 2006. Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal

- a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins. *Hum Mol Genet*. 15:1984-94.
- Stebbins-Boaz, B., Q. Cao, C.H. de Moor, R. Mendez, and J.D. Richter. 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell*. 4:1017-27.
- Stetler, A., C. Winograd, J. Sayegh, A. Cheever, E. Patton, X. Zhang, S. Clarke, and S. Ceman. 2006. Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp. *Hum Mol Genet*. 15:87-96.
- Stoyanova, V., and A.T. Hoogeveen. 2005. Fragile X syndrome: an epigenetic desease. *Research Signpost*.
- Sun, D., B. Thompson, B.E. Cathers, M. Salazar, S.M. Kerwin, J.O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, and L.H. Hurley. 1997. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem.* 40:2113-6.
- Sung, Y.J., N. Dolzhanskaya, S.L. Nolin, T. Brown, J.R. Currie, and R.B. Denman. 2003. The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *J Biol Chem.* 278:15669-78.
- Sutherland, G.R. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*. 197:265-6.
- Takei, N., M. Kawamura, K. Hara, K. Yonezawa, and H. Nawa. 2001. Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. *J Biol Chem*. 276:42818-25.
- Tamanini, F., C. Bontekoe, C.E. Bakker, L. van Unen, B. Anar, R. Willemsen, M. Yoshida, H. Galjaard, B.A. Oostra, and A.T. Hoogeveen. 1999. Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet*. 8:863-9
- Tamanini, F., L.L. Kirkpatrick, J. Schonkeren, L. van Unen, C. Bontekoe, C. Bakker, D.L. Nelson, H. Galjaard, B.A. Oostra, and A.T. Hoogeveen. 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*. 9:1487-93.
- Tamanini, F., R. Willemsen, L. van Unen, C. Bontekoe, H. Galjaard, B.A. Oostra, and A.T. Hoogeveen. 1997. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet*. 6:1315-22.
- Tashiro, A., and R. Yuste. 2003. Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histol Histopathol*. 18:617-34.
- Tashiro, A., and R. Yuste. 2004. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci*. 26:429-40.
- Tassone, F., R.J. Hagerman, D.Z. Loesch, A. Lachiewicz, A.K. Taylor, and P.J. Hagerman. 2000a. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet*. 94:232-6.
- Tassone, F., R.J. Hagerman, A.K. Taylor, L.W. Gane, T.E. Godfrey, and P.J. Hagerman. 2000b. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet*. 66:6-15.
- Teixeira, D., U. Sheth, M.A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, and R. Parker. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna*. 11:371-82.
- Thomas, G.M., and R.L. Huganir. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 5:173-83.
- Tiedge, H., W. Chen, and J. Brosius. 1993a. Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J Neurosci*. 13:2382-90.

- Tiedge, H., A. Zhou, N.A. Thorn, and J. Brosius. 1993b. Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J Neurosci*. 13:4214-9.
- Todd, P.K., K.J. Mack, and J.S. Malter. 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*. 100:14374-8.
- Toni, N., P.A. Buchs, I. Nikonenko, C.R. Bron, and D. Muller. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*. 402:421-5.
- Torre, E.R., and O. Steward. 1992. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci.* 12:762-72.
- Torroja, L., M. Packard, M. Gorczyca, K. White, and V. Budnik. 1999. The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci.* 19:7793-803.
- Trottier, Y., G. Imbert, A. Poustka, J.P. Fryns, and J.L. Mandel. 1994. Male with typical fragile X phenotype is deleted for part of the FMR1 gene and for about 100 kb of upstream region. *Am J Med Genet*. 51:454-7.
- Trybus, K.M. 2008. Myosin V from head to tail. Cell Mol Life Sci. 65:1378-89.
- Tsiouris, J.A., and W.T. Brown. 2004. Neuropsychiatric symptoms of fragile X syndrome: pathophysiology and pharmacotherapy. *CNS Drugs*. 18:687-703.
- Turner, G., A. Daniel, and M. Frost. 1980. X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr*. 96:837-41.
- Turner, G., T. Webb, S. Wake, and H. Robinson. 1996. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 64:196-7.
- Ule, J., K. Jensen, A. Mele, and R.B. Darnell. 2005. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*. 37:376-86.
- Unterholzner, L., and E. Izaurralde. 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell*. 16:587-96.
- Vallet, P., Y. Charnay, K. Steger, E. Ogier-Denis, E. Kovari, F. Herrmann, J.P. Michel, and I. Szanto. 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*. 132:233-8.
- Valverde, R., I. Pozdnyakova, T. Kajander, J. Venkatraman, and L. Regan. 2007. Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. *Structure*. 15:1090-8.
- Van Dam, D., R. D'Hooge, E. Hauben, E. Reyniers, I. Gantois, C.E. Bakker, B.A. Oostra, R.F. Kooy, and P.P. De Deyn. 2000. Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in Fmr1 knockout mice. *Behav Brain Res.* 117:127-36.
- van Dijk, E., N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle, and B. Seraphin. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J.* 21:6915-24.
- Van Kanegan, M.J., D.G. Adams, B.E. Wadzinski, and S. Strack. 2005. Distinct protein phosphatase 2A heterotrimers modulate growth factor signaling to extracellular signal-regulated kinases and Akt. *J Biol Chem.* 280:36029-36.
- Verkerk, A.J., E. de Graaff, K. De Boulle, E.E. Eichler, D.S. Konecki, E. Reyniers, A. Manca, A. Poustka, P.J. Willems, D.L. Nelson, and et al. 1993. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet*. 2:399-404.
- Verkerk, A.J., M. Pieretti, J.S. Sutcliffe, Y.H. Fu, D.P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M.F. Victoria, F.P. Zhang, and 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*. 65:905-14.
- Wan, L., T.C. Dockendorff, T.A. Jongens, and G. Dreyfuss. 2000. Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol Cell Biol.* 20:8536-47.
- Wang, B., T.M. Love, M.E. Call, J.G. Doench, and C.D. Novina. 2006. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell*. 22:553-60.
- Warren, S.T. 2007. The Epigenetics of Fragile X Syndrome. Cell Stem Cell. 1:488-489.
- Waung, M.W., B.E. Pfeiffer, E.D. Nosyreva, J.A. Ronesi, and K.M. Huber. 2008. Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*. 59:84-97.
- Weiler, I.J., and W.T. Greenough. 1993. Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:7168-71.
- Weiler, I.J., S.A. Irwin, A.Y. Klintsova, C.M. Spencer, A.D. Brazelton, K. Miyashiro, T.A. Comery, B. Patel, J. Eberwine, and W.T. Greenough. 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5395-400.
- Weitzer, S., and J. Martinez. 2007. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature*. 447:222-6.
- Welch, J.M., J. Lu, R.M. Rodriguiz, N.C. Trotta, J. Peca, J.D. Ding, C. Feliciano, M. Chen, J.P. Adams, J. Luo, S.M. Dudek, R.J. Weinberg, N. Calakos, W.C. Wetsel, and G. Feng. 2007. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*. 448:894-900.
- Welch, J.M., D. Wang, and G. Feng. 2004. Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *J Comp Neurol*. 472:24-39.
- Westmark, C.J., and J.S. Malter. 2007. FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol.* 5:e52.
- Wilhelm, J.E., M. Hilton, Q. Amos, and W.J. Henzel. 2003. Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol.* 163:1197-204.
- Wolff, D.J., K.M. Gustashaw, V. Zurcher, L. Ko, W. White, L. Weiss, D.L. Van Dyke, S. Schwartz, and H.F. Willard. 1997. Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. *Hum Genet*. 100:256-61.
- Yan, K.S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng, and M.M. Zhou. 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 426:468-74.
- Yan, Q.J., M. Rammal, M. Tranfaglia, and R.P. Bauchwitz. 2005. Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*. 49:1053-66.
- Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304:594-6.
- Yu, S., M. Pritchard, E. Kremer, M. Lynch, J. Nancarrow, E. Baker, K. Holman, J. Mulley, S. Warren, D. Schlessinger, and A. Et. 1991. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*. 252:1179-1181.
- Yuan, Y.R., Y. Pei, J.B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl, and D.J. Patel. 2005. Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*. 19:405-19.

- Zalfa, F., S. Adinolfi, I. Napoli, E. Kuhn-Holsken, H. Urlaub, T. Achsel, A. Pastore, and C. Bagni. 2005. Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. *J Biol Chem*. 280:33403-10.
- Zalfa, F., B. Eleuteri, K.S. Dickson, V. Mercaldo, S. De Rubeis, A. di Penta, E. Tabolacci, P. Chiurazzi, G. Neri, S.G. Grant, and C. Bagni. 2007. A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci*. 10:578-87.
- Zalfa, F., M. Giorgi, B. Primerano, A. Moro, A. Di Penta, S. Reis, B. Oostra, and C. Bagni. 2003. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell.* 112:317-27.
- Zanotti, K.J., P.E. Lackey, G.L. Evans, and M.R. Mihailescu. 2006. Thermodynamics of the fragile X mental retardation protein RGG box interactions with G quartet forming RNA. *Biochemistry*. 45:8319-30.
- Zecca, L., M.B. Youdim, P. Riederer, J.R. Connor, and R.R. Crichton. 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 5:863-73.
- Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen. 2003. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:9779-84.
- Zhang, H.L., T. Eom, Y. Oleynikov, S.M. Shenoy, D.A. Liebelt, J.B. Dictenberg, R.H. Singer, and G.J. Bassell. 2001a. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*. 31:261-75.
- Zhang, Y., J.P. O'Connor, M.C. Siomi, S. Srinivasan, A. Dutra, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 1995. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *Embo J.* 14:5358-66.
- Zhang, Y.Q., A.M. Bailey, H.J. Matthies, R.B. Renden, M.A. Smith, S.D. Speese, G.M. Rubin, and K. Broadie. 2001b. Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell*. 107:591-603.
- Zhang, Y.Q., H.J. Matthies, J. Mancuso, H.K. Andrews, E. Woodruff, 3rd, D. Friedman, and K. Broadie. 2004. The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. *Dev Biol.* 270:290-307.

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE LA PROTÉINE FMRP DANS LE MÉTABOLISME DES ARN messagers

Le syndrome de l'X fragile représente la cause la plus fréquente de retard mental héréditaire. Ce syndrome résulte de l'absence de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) en raison de l'expansion d'une répétition de trinucléotides CGG dans la région 5' non traduite du gène *Fmr1*. L'absence de FMRP conduit à des altérations des épines dendritiques dans les neurones ainsi qu'à des défauts de la synthèse protéique locale dans les synapses. FMRP est une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de gènes cibles importants pour la plasticité synaptique. L'ensemble des données actuelles indiquent que FMRP est impliquée dans différents aspects du métabolisme des ARNm incluant le transport, la stabilité et la traduction. Les mécanismes moléculaires du contrôle post-transcriptionnel exercé par FMRP sur ses ARNm cibles sont cependant encore incompris. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre le rôle moléculaire de FMRP dans le métabolisme de ses ARNm cibles.

Il avait été montré précédemment au laboratoire que FMRP lie spécifiquement les ARNm contenant un motif de quartet de guanines (G-quartet). Dans un premier temps, nous avons recherché la fonction de l'interaction entre FMRP et son propre ARNm *Fmr1*, une des cibles les mieux connues de FMRP et contenant un motif G-quartet. Nous avons montré que l'interaction de FMRP avec son ARNm n'affecte pas sa traduction ni sa localisation contrairement à ce qui était attendu. En revanche, le site de fixation de FMRP sur l'ARNm *Fmr1* est un activateur d'épissage (ESE) et la modification du niveau intracellulaire de FMRP altère son épissage alternatif. L'ensemble de nos données indiquent que la liaison de FMRP à l'ARNm *Fmr1* affecte des évènements d'épissage au voisinage du site d'interaction et suggèrent l'existence d'une boucle d'autorégulation. Par ailleurs, nous avons montré qu'un G-quartet peut influencer de manières différentes l'expression d'un gène rapporteur en fonction de sa position en région 5' ou 3' non traduite et nous avons contribué à caractériser un nouveau motif ARN dont l'interaction avec FMRP semble activer la traduction.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le lien fonctionnel entre FMRP et la machinerie RISC précédemment proposé par plusieurs laboratoires. Nous avons étudié le lien fonctionnel entre FMRP, les P-Bodies (sites d'accumulation des ARNm réprimés par la machinerie RISC) et les granules de stress (sites de stockage et/ou dégradation des ARNm en condition de stress). Nos travaux montrent que FMRP a des propriétés de localisation cellulaire et d'association aux ARNm très distinctes de celles du RISC. D'autre part, l'efficacité de la machinerie RISC est indépendante de la présence de FMRP, excluant un impact direct de FMRP sur la fonction de RISC. Par ailleurs, nous avons montré que FMRP contribue positivement à la formation des granules de stress suggèrant que FMRP joue un rôle dans le métabolisme des ARNm lors d'un stress cellulaire.

Jusqu'à présent, la fonction de FMRP la plus couramment proposée vis à vis des ARNm était celle de répresseur traductionnel. L'ensemble de nos travaux suggère que cette fonction est vraisemblablement plus complexe.