

T **ransport et localisation d'ARN messagers chez les mammifères : rôle de la protéine staufer**

Il est maintenant admis que le cytosquelette joue un rôle important dans le transport et l'ancrage des ARN messagers (ARNm), tant aux sites de transcription et de maturation de l'ARN dans le noyau qu'aux sites de traduction et de dégradation dans le cytoplasme [1]. Une des conséquences de ces interactions entre l'ARNm et le cytosquelette est de permettre une distribution asymétrique de l'ARNm dans des compartiments subcellulaires. Ce phénomène a été décrit aussi bien dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales, et dans toutes les espèces animales de la drosophile à l'homme [2]. La distribution asymétrique de l'ARNm permet de cibler la production de protéines spécifiques à des endroits précis de la cellule, grâce à la traduction locale des messagers. Le transport et la localisation d'ARNm particuliers jouent un rôle important dans des phénomènes tels que l'apprentissage et la mémoire [3], la plasticité synaptique [4], la motilité cellulaire [5], le développement des axes lors de l'embryogenèse [2, 6] et la division cellulaire asymétrique [7, 8] (*m/s* 1996, n° 1, p. 123).

Le ciblage et la localisation asymétrique de l'ARNm sont le résultat d'une cascade d'événements ordonnés qui, croit-on, consiste en (1) la formation d'un complexe ribonucléoprotéique; (2) la translocation du complexe vers les sites d'ancrage; (3) l'ancrage des particules au cytosquelette; et (4) la traduction locale des ARNm [9]. Les mécanismes moléculaires contrôlant la localisation de l'ARNm ne sont toutefois pas très bien connus, essentiellement parce que les principaux constituants des complexes ribonucléopro-

téiques n'ont pas encore été identifiés. Bien que le signal qui permet de reconnaître et de transporter les ARNm ait été caractérisé dans la région 3'-non traduite UTR de plusieurs ARNm, très peu de protéines pouvant s'y associer ont été identifiées. La protéine staufer de la drosophile, qui est un membre de la famille des protéines qui fixent l'ARN double-brin [10], est la mieux caractérisée pour son rôle dans le transport de l'ARNm dans les cellules [11]. Elle est essentielle pour localiser les ARNm maternels bicoid et oskar impliqués dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur lors de l'embryogenèse [2, 6]. Staufer reconnaît et s'associe à un signal de localisation constitué d'une série de tiges/boucles d'ARN située dans la région 3'UTR du transcrite *bicoid* [12]. De même, lors de la différenciation des neuroblastes durant les stades larvaires, staufer participe à un mécanisme de décisions binaires qui établit l'identité des cellules [7,

8]. Cela s'accomplit par la localisation asymétrique de la protéine et du transcrite *prospero* dans seulement une des deux cellules filles, provoquant ainsi la différenciation asymétrique des cellules [13].

Pour étudier le phénomène de transport de l'ARNm chez les mammifères, nous avons cloné, à partir d'une génothèque d'ADNc du système nerveux central humain, l'homologue humain de staufer (hStau) (*figure 1*) [14]. La séquence primaire, déduite de la séquence de l'ADNc révèle une protéine semblable à la protéine staufer de la drosophile, dont la position relative et la séquence des domaines fonctionnels sont bien conservées. L'épissage alternatif du gène *stau* humain engendre plusieurs transcrits qui codent pour différentes isoformes de la protéine [14]. Le rôle de chaque isoforme est encore inconnu, bien qu'il semble qu'au moins l'une d'entre elles puisse être impliquée dans la régulation du transport.

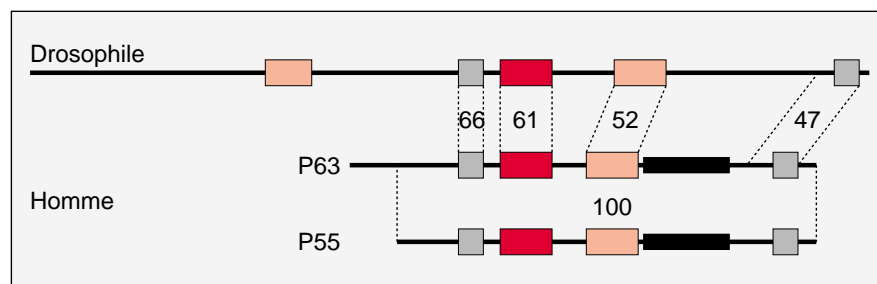


Figure 1. **Représentation schématique de la protéine staufer.** Schéma comparatif des protéines staufer de la drosophile et de l'homme. La boîte rouge et les boîtes bistres représentent respectivement le domaine majeur et les domaines mineurs de liaison à l'ARN double-brin. Les boîtes grises correspondent aux domaines qui ont une similitude de séquence avec la région carboxy-terminale des domaines de liaison à l'ARN, mais qui sont dépourvus d'une telle activité. La boîte noire représente le domaine de fixation à la tubuline. Les pourcentages d'identité entre les séquences des différents domaines sont indiqués.

L'analyse de la séquence de cette protéine a révélé la présence de plusieurs domaines consensus pouvant lier l'ARN double-brin. Des expériences *in vitro* ont confirmé que hStau lie l'ARN double-brin ou une structure secondaire complexe [14, 15]. L'utilisation de mutants de délétion nous a permis de démontrer que les domaines dsRBD2 et dsRBD3 (*double-stranded RNA-binding domain*) peuvent individuellement fixer l'ARN, le domaine dsRBD2 étant toutefois le déterminant majeur [14]. Cependant, comme cela a été observé précédemment avec la protéine de drosophile, hStau reconnaît *in vitro* tous les ARN qui peuvent former des tiges double-brin, et ce, indépendamment de leur séquence primaire. Il est possible que d'autres protéines ou ARN associés à hStau dans les complexes ribonucléoprotéiques et/ou des modifications post-traductionnelles de hStau soient nécessaires pour conférer une certaine spécificité de reconnaissance *in vivo*. Les domaines dsRBD1 et dsRBD4 ne possèdent pas cette capacité de fixer l'ARN, et pourraient être impliqués dans des interactions protéine/protéine, ce qui est le cas chez la drosophile [1].

L'analyse de la séquence de staufer a également révélé la présence d'un domaine semblable à un domaine de la protéine MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) requis pour l'ancrage de la protéine aux microtubules. Cela est intéressant puisque le transport de plusieurs ARNm dépend d'un réseau de microtubules intact. Nous avons donc vérifié si hStau peut fixer la tubuline. *In vitro*, nous avons montré, par des expériences de buvardage de type *Far-Western*, que hStau fixe la tubuline, et que le déterminant moléculaire impliqué dans cette fonction est localisé dans le domaine commun à MAP1B [14]. Dans les mêmes conditions, hStau ne fixe pas l'actine. En accord avec cette observation, nous avons démontré, au niveau des dendrites de neurones en culture, que le transport des complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels hStau est présent, est sensible à la présence de produits qui dépolymérisent les microtubules. Une association entre staufer de rat et les

microtubules dans les dendrites a également été observée par microscopie électronique [16]. Cependant, dans les petites cellules, telles que les cellules COS ou HeLa, nous n'avons pu mettre en évidence une association directe entre hStau et les microtubules. Il est possible que l'association du complexe ribonucléoprotéique au réseau de microtubules soit transitoire et dynamique, ou encore qu'elle ne soit nécessaire que dans certains types cellulaires dans lesquels le transport de l'ARN doit s'effectuer sur de longues distances. D'ailleurs, le mécanisme par lequel les complexes ribonucléoprotéiques sont liés au cytosquelette est peu connu et probablement assez complexe. On comprend encore mal comment une même protéine, staufer, transporte différents ARNm *via* différents éléments du cytosquelette. De même, la nature du lien moléculaire qui permet l'association des ribonucléoprotéines au cytosquelette et des moteurs moléculaires qui permettent leur déplacement est encore inconnue.

Le nombre de molécules Staufer liées aux microtubules ne représente toutefois qu'une fraction de la quantité totale de cette protéine dans la cellule. Tant dans le corps cellulaire des neurones que dans les cellules COS ou HeLa, staufer est principale-

ment associée au réticulum endoplasmique rugueux (RER) (*figure 2*) [14-16]. Puisque la protéine ne contient pas de peptide signal, elle est très probablement cytosolique et associée à une structure du RER, et on a peu de chances de la trouver dans la membrane ou la lumière du RER. Les polyribosomes associés au RER sont une cible potentielle pour staufer, puisque staufer co-migre avec les polyribosomes dans un gradient de saccharose [15]. Un lien entre le transport/localisation de l'ARNm et le réticulum endoplasmique a été décrit également chez la drosophile et le xénope [17, 18].

Même si son rôle exact chez les mammifères reste encore à définir, l'ensemble de nos résultats laisse penser que staufer joue un rôle important dans le transport et la localisation de transcrits, tout comme la protéine homologue le fait chez la drosophile. Selon nos résultats, staufer serait d'abord ancrée au réticulum endoplasmique rugueux, dans la région périmoléculaire, sous forme de complexes protéiques (*figure 3*). En réponse à un signal, une fraction de ces complexes serait recrutée et migrerait vers la périphérie de la cellule par un mécanisme encore mal défini. Le complexe serait alors ancré au cytosquelette pour être éventuellement traduit localement. La transition

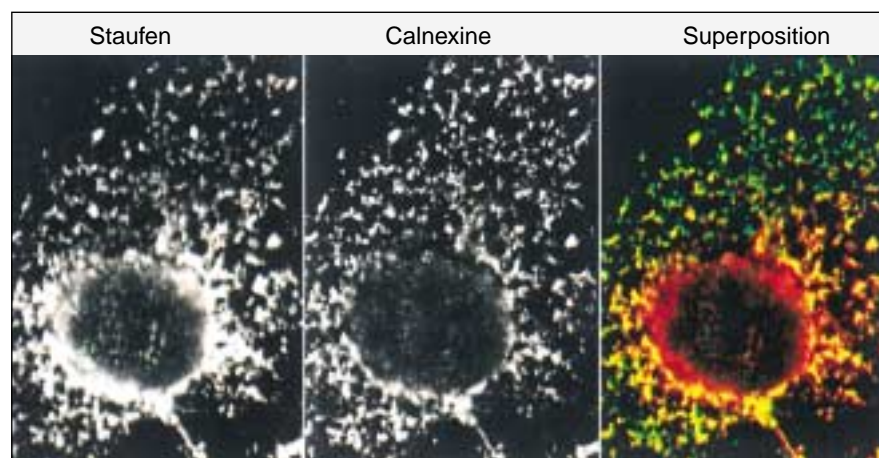


Figure 2. Localisation subcellulaire de staufer. L'ADNc codant pour la protéine hStau couplée à l'épitope HA a été transfecté dans les cellules COS7. L'expression de la protéine hStau/HA est révélée par un anticorps anti-HA (rouge). La cellule est également colorée par un anticorps qui reconnaît la protéine calnexine, qui est un marqueur du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (vert). La superposition des deux images (jaune) démontre que hStau/HA co-localise avec le marqueur du RER (réticulum endoplasmique rugueux).

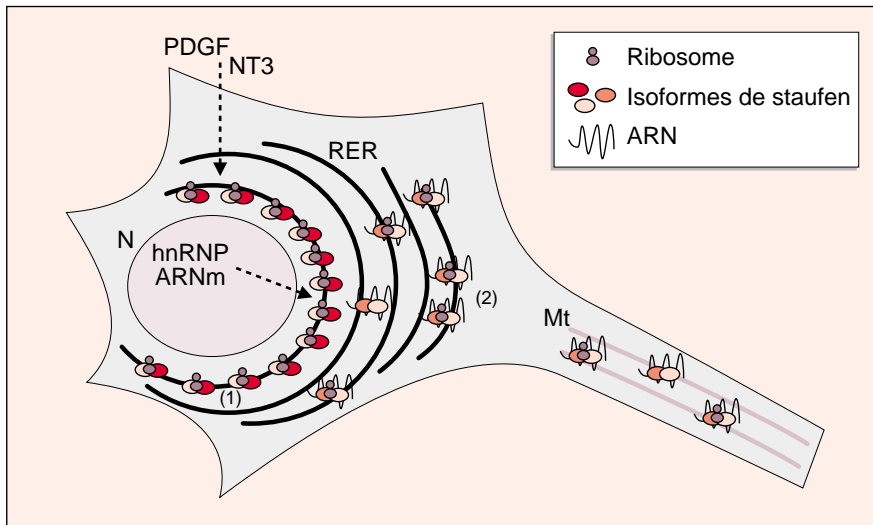


Figure 3. Rôle de staufen dans le transport de l'ARNm chez les mammifères. Le transport de l'ARNm pourrait s'effectuer en plusieurs étapes. Les complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels se trouve staufen seraient d'abord ancrés au niveau du RER dans la région périnucléaire (1). Nous ne savons pas encore si ces complexes sont déjà associés à de l'ARNm ou non. Les complexes migreraient ensuite vers leur destination subcellulaire (2) à la suite d'un signal qui permettrait la transition entre l'ancrage et le transport. Ce signal pourrait être le transport nucléocytoplasmique de l'ARNm ou des stimulus transmembranaires provoqués par des facteurs de croissance. Dans les petites cellules, hStau est associée au réticulum endoplasmique rugueux. Dans les neurones, hStau est associée au RER, ainsi qu'aux microtubules au niveau des dendrites. Les complexes seraient alors ancrés en périphérie de la cellule, où ils sont localement traduits. N: noyau; Mt: microtubule; RER: réticulum endoplasmique rugueux; PDGF: platelet derived growth factor; NT3: neurotrophine 3; RNP: ribonucléoprotéines.

entre les complexes liés au RER et ceux qui sont transportés dans la cellule pourrait dépendre du transport nucléocytoplasmique de l'ARNm. Le fait que certaines protéines de la famille des hnRNP, protéines associées entre autres au transport nucléocytoplasmique des ARNm, soient aussi associées à des complexes ribonucléoprotéiques de transport cytoplasmiques chez les mammifères et chez le xénope est compatible avec cette hypothèse [19, 20]. La transition pourrait également être due à l'activation de voies de signalisation en réponse à un stimulus extérieur. Le transport asymétrique de certains ARNm dans les fibroblastes, les oligodendrocytes et les neurones est d'ailleurs influencé par différents facteurs de croissance, tels que le facteur dérivé des plaquettes (PDGF, *platelet-derived growth factor*) ou les neurotrophines [20, 21]. Nous n'excluons pas

la possibilité que staufen puisse jouer d'autres rôles dans les cellules, par exemple au niveau de la traduction de l'ARNm ou du ciblage d'une sous-population d'ARNm codant pour les protéines membranaires ou transloquées au RER.

Staufen représente un des premiers outils moléculaires pour étudier plus en profondeur les mécanismes du transport et de la localisation de l'ARNm chez les mammifères. L'identification et la caractérisation cellulaire et moléculaire de staufen permettront de mieux comprendre les mécanismes du transport de l'ARNm. Cela est important puisque le transport et la traduction locale de certains ARNm sont essentiels à plusieurs processus physiologiques tels que l'apprentissage et la mémoire. Il est également important de comprendre les processus associés à l'ARNm et le destin fonctionnel de

ceux-ci dans les cellules, au moment où des ribozymes et des ARN antisens sont utilisés en tant qu'outils thérapeutiques pour cibler les ARNm et traiter diverses maladies ■

Remerciements

Nous remercions Mme Louise Wickham pour son aide technique et le Dr Ivan Robert Nabi (Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal) pour son importante contribution au niveau de la biologie cellulaire. Ce travail a été réalisé grâce à une subvention du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) à LDG. TD est titulaire d'une bourse d'études supérieures du CRSNG.

**Luc DesGroseillers
Thomas Duchaine
Ming Luo**

Département de biochimie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada.

RÉFÉRENCES

- Jansen RP. RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* 1999; 13: 455-66.
- St-Johnston D. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 1995; 81: 161-70.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, *et al.* Synapse-specific, long-term facilitation of Aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 1997; 91: 927-38.
- Kang H, Schuman EM. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 1996; 273: 1402-6.
- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. β -actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol* 1997; 136: 1263-70.
- Lasko P. RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J* 1999; 13: 421-33.
- Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 1998; 391: 792-5.
- Li P, Yang X, Wasser M, Cai Y, Chia W. Inscutable and staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 1997; 90: 437-47.

RÉFÉRENCES

9. Wilhelm JE, Vale RD. RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol* 1993; 123: 269-74.
10. St-Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10979-83.
11. St-Johnston D, Beuchle D, Nüsslein-Volhard C. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 1991; 66: 51-63.
12. Ferrandon D, Elphick L, Nüsslein-Volhard C, St-Johnston D. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 1994; 79: 1221-32.
13. Schweisguth F. Ségrégation asymétrique de régulateurs de l'identité cellulaire lors de la mitose. *Med Sci* 1996; 12: 203-6.
14. Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2220-30.
15. Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2212-9.
16. Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, et al. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 1999; 19: 288-97.
17. Wilsch-Bräuninger M, Schwarz H, Nüsslein-Volhard C. A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 1997; 139: 817-29.
18. Deshler JO, Highett MI, Schnapp BJ. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 1997; 276: 1128-31.
19. Mowry KL, Cote AC. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J* 1999; 13: 435-45.
20. Carson JH, Kwon S, Barbarese E. RNA trafficking in myelinating cells. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 607-12.
21. Bassell GJ, Olevnikov Y, Singer RH. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J* 1999; 13: 447-54.

TIRÉS À PART

L. DesGroseillers.

m/s n° 10, vol. 15, octobre 99

INSERM
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ
ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE

BIOLOGIE MOLECULAIRE

MODULE I : Approche générale de biologie moléculaire :

- objet d'étude : gène, génome, ADN, ARN
- techniques courantes : southern, northern, PCR, séquence...
- outils de biologie moléculaire : enzymes, bactéries, phages, plasmide

MODULE II : Approche spécifique de biologie moléculaire :

- contrôle de la transcription
- banque et clonage positionnel
- interactions protéine-protéine cytogénétique moléculaire...

Inscription : Les modules sont dépendants mais peuvent être suivis indépendamment l'un de l'autre

Public : Chercheurs, Ingénieurs, Techniciens.

Objectifs : Acquérir, mettre à jour, approfondir vos connaissances théoriques.

Moyens : 3 niveaux (déterminés par QCM avant les stages).

1 journée de formation par semaine, cours théoriques de 3 h 30 et travaux dirigés.

Évaluation des connaissances en fin de stage.

Responsable scientifique : Marc Delpech

Dates et lieux : Du 4 novembre au 16 décembre 1999 (pour le 1^{er} module).

Du 2 mars au 28 avril 2000 (pour le 2^e module).

Lieu : Hôpital Saint-Louis (salle de cours du bâtiment INSERM).

Public : • Chercheurs, Ingénieurs, Techniciens (ayant une connaissance en biologie moléculaire).

Objectifs : Acquérir une autonomie dans les techniques de PCR et RT-PCR.

Programme : • Optimisation des paramètres de la PCR • Clonage des produits d'amplification • Synthèse de cDNA et amplification de transcrits.

Moyens : • Cours théoriques • Cours pratiques.

Enseignants : • P. Bausero, S. Memet et P. Sebillon.

Dates et lieux : du 26 au 28 octobre 1999
École de laboratoire – Hôpital de la Salpêtrière
47, boulevard de l'Hôpital – 75013 Paris.

Renseignements et inscriptions : Véronique Springhetti
ADR 12 Paris VII Saint-Lazare
107, rue du Faubourg-Saint-Denis
75475 Paris Cedex 10
Tél. : 01 45 23 73 51 – Fax : 01 45 23 73 42
Email : spring@ext.jussieu.fr