



HAL
open science

Rôle de la protéine liant l'ARN, IMP-2 (Insulin-like Growth factor II mRNA-binding-Protein 2) au cours de la myogenèse normale

Sylvain Cuvellier

► **To cite this version:**

Sylvain Cuvellier. Rôle de la protéine liant l'ARN, IMP-2 (Insulin-like Growth factor II mRNA-binding-Protein 2) au cours de la myogenèse normale. Biologie cellulaire. 2011. hal-01478706

HAL Id: hal-01478706

<https://ephe.hal.science/hal-01478706>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par M. Sylvain CUVELLIER

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

TITRE : Rôle de la protéine liant l'ARN, IMP-2 (Insulin-like Growth factor II mRNA-binding-Protein 2) au cours de la myogenèse normale

Soutenu le 17 mars 2011

devant le jury suivant :

Pr. Stéphane Richard

Dr. Luisa Dandolo – Examineur

Dr. Dominique Weil– Examineur

Mémoire préparé sous la direction du

Dr. Ania POLESSKAYA

Laboratoire : CNRS FRE3239,
Epigénétique et Cancer
7, rue Guy Moquet
94801 VILLEJUIF Cedex
anna.poleskaya@cea.fr

Directeur :
Dr. Annick HAREL-BELLAN

Et du

Pr. Yves BENYAMIN

Laboratoire EPHE :
Motilité cellulaire - UMR 5235
Université Montpellier II
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 05
benyamin@univ-montp2.fr

Directeur:
Dr Catherine BRAUN BRETON

RESUME

Le maintien de l'équilibre entre prolifération et différenciation est assuré par la régulation de l'expression de gènes qui sont impliqués dans la différenciation ou la prolifération cellulaire, ou qui gouvernent le passage d'une voie à l'autre. Une altération de cet équilibre peut ainsi conduire à des situations pathologiques majeures comme la formation de tumeurs. Ainsi les cellules cancéreuses prolifèrent de manières incontrôlées et échappent au programme de différenciation cellulaire. IMP-2 est une protéine retrouvée surexprimée dans les rhabdomyosarcomes, cellules cancéreuses issues de précurseurs myogéniques, et exprimée au cours du développement embryonnaire. Pourtant, aucune étude ne s'était encore penchée sur son rôle au cours la myogénèse normale, par opposition aux rhabdomyosarcomes. Nous pensons que la compréhension des mécanismes liés à la voie IMP-2 normale, pourrait aider à mieux comprendre pourquoi ces protéines sont retrouvées surexprimées dans les rhabdomyosarcomes.

Nous avons démontré qu'IMP-2 interagit avec un grand nombre d'ARNm, et la plupart de ces interactions ont été infirmées ou confirmées par la présence dans le complexe protéique d'IMP-2 de ces ARNm. Nous avons aussi pu démontrer qu'IMP-2 fait partie de complexes protéiques impliqués dans l'épissage, la traduction, ou encore le transport des ARN.

Même si l'inhibition d'IMP-2 semble provoquer des remaniements morphologiques visibles sur les lignées de myoblastes de souris (C2C12), son rôle au sein de la cellule n'est pas encore clair. Il paraît évident qu'IMP-2 a un rôle au cours de la myogénèse, même si nous n'avons pas pu déterminer un rôle précis. Ses différents partenaires interagissent avec IMP-2 dans différents sous complexes ayant certainement des rôles distincts et agissant chacun sur des ARN différents.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| RESUME | 2 |
| TABLE DES MATIERES | 3 |
| ABBREVIATIONS..... | 4 |
| INTRODUCTION..... | 7 |
| 1) Equilibre entre prolifération et différenciation. | 7 |
| 2) La différenciation myogénique | 7 |
| 2.1 Adhésion et motilité cellulaire | 8 |
| 2.2 Régulation de l'expression génique | 11 |
| 2.3 Mécanismes post-transcriptionnels..... | 13 |
| 3) Localisation de l'ARN au cours du développement..... | 14 |
| 4) Protéines se liant à l'ARNm | 15 |
| 4.1 Généralités | 15 |
| 4.2 La protéine LIN-28 | 16 |
| 4.3 Insulin-like growth factor (IGF-II)..... | 16 |
| 4.4 IMPs : insulin-growth factor II mRNA binding protein..... | 17 |
| 4.5 Rôles putatifs des IMPs dans le développement et la tumorigenèse..... | 18 |
| 5) Interférence à l'ARN (RNAi) | 19 |
| 5.1 Découverte | 20 |
| 5.2 Mécanisme | 20 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 22 |

ABBREVIATIONS

ADN = Acide DésoxyriboNucléique

Ago = protéines « Argonaute »

ARN = Acide RiboNucléique

ARNdb = Acide RiboNucléique double brin

ARNi = mécanisme d'ARN interférence

ARNm = ARN messenger

bHLH= Basic Helix-Loop-Helix

BSA = Bovine Serum Albumin

CAM = Cell Adhesion Molecules

CDK = Cyclin-Dependent-Kinase

CRD-BP1 = c-myc coding region determinant binding protein 1

DAPI = 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DEPC = Diethylenepycarbonate (inhibe les RNases)

DRB = 5,6-Dichlorobenzimidazole-riboside (inhibe la transcription)

DTT = Dithiothréitol (agent réducteur)

EDTA = acide Ethylène Diamine Tetra Acétique (chélateur de cations divalents)

EIF3 β = eukaryotic translation initiation factor 3

EGF= Epidermal Growth Factor

FGF= Fibroblast Growth Factor

GFP = Green Fluorescent Protein

HA (peptide) = influenza hemagglutinin

HSC70 = heat shock cognate 70 = HSPA8

HSP90 = heat shock protein 90

ID (protéines)= protéines inhibant la liaison à l'ADN des protéines bHLH

IgCAM = immunoglobulin like cell adhesion molecule

IGF-II = Insulin-like growth factor II

IMP-1 = Insulin-like growth factor 2-mRNA binding protein 1

IMP-2 = Insulin-like growth factor 2-mRNA binding protein 2
IMP-3 = Insulin-like growth factor 2-mRNA binding protein 3
KH domain = domaine d'homologie à la protéine HnRNP K
KOC = K Homology containing Protein
MCK = Muscle Creatin Kinase
MEC= Matrice ExtraCellulaire
MES = Acide Sulfonique Morpholinoethane
(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
MHC = Myosin Heavy Chain
miRNA = micro RNA
MOPS = Acide Sulfonique de Morpholinopropane
(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)
MOV10 = Moloney leukemia virus 10 homolog (mouse)
MRFs= Myogenic Regulatory Factors
MTs = microtubules
MuRF-3 = muscle-specific RING-finger 3
NaDoc = Sodium deoxy-cholate, détergent ionique des liaisons protéiques
NCAM = Neural Cell Adhesion Molecule
PBS = Phosphate buffered saline
PCR = Polymerase Chain Reaction
PMSF = PhenylMethaneSulfonylFluoride (inhibiteur de sérine protéase)
qRT-PCR = Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
Rb= protéine du Rétinoblastome
RENT-1 (UPF1) = Regulator Of Nonsense Transcripts 1
RISC = RNA-induced silencing complex, complexe protéique induisant la répression de la traduction d'un ARN messager
RMS = rhabdomyosarcomes
RNase = Ribonucléase
RRM = domaine de reconnaissance de l'ARN (RNA Recognition Motif)
SDS = Sodium Dodécyl Sulfat, détergent

shRNA = short hairpin RNA (petit ARN interférant, double brin relié par une structure tige boucle)

siARN = small interfering RNA (petit ARN interférant)

TNF α = Tumor necrosis factor alpha

TGF β = Transforming Growth Factor β

UTR (3' et 5') = UnTranslated Region (région non traduite)

VCAM = Vascular cell adhesion protein

Vg1-RBP = Vg1 RNA-Binding Protein, protéine liant l'ARN messager de Xénope Vg1

Zbp1 = Zipcode-binding protein 1

INTRODUCTION

1) Equilibre entre prolifération et différenciation.

L'homéostasie cellulaire résulte d'un équilibre entre plusieurs phénomènes : prolifération, différenciation et mort cellulaire programmée (apoptose). Le contrôle de cet équilibre est fondamental au cours de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire, le vieillissement et la régénération des tissus.

Le maintien de cet équilibre est assuré par la régulation de l'expression de gènes qui sont impliqués dans la différenciation ou la prolifération cellulaire, ou qui gouvernent le passage d'une voie à l'autre. Une altération de cet équilibre peut ainsi conduire à des situations pathologiques majeures comme la formation de tumeurs. Ainsi les cellules cancéreuses prolifèrent de manière incontrôlée et échappent au programme de différenciation cellulaire.

Dans le système musculaire, prolifération cellulaire et différenciation terminale sont deux événements mutuellement exclusifs. En effet, le processus de différenciation nécessite l'arrêt complet de la prolifération, ainsi les effecteurs de la différenciation terminale sont également les répresseurs de la prolifération.

2) La différenciation myogénique

Le muscle squelettique est un tissu dynamique ayant la propriété de se régénérer notamment grâce à l'existence d'une population de cellules souches multipotentes appelées cellules satellites. Ces cellules issues des tissus mésodermiques donnent naissance aux myoblastes. Les myoblastes (cellules musculaires précurseurs d'une cellule musculaire adulte différenciée) possèdent encore la capacité de se diviser, cependant ils ne possèdent pas la multipotence des

cellules souches, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent se différencier qu'en cellules musculaires. Ces cellules sont dites déterminées (Tajbakhsh 2005).

Lors de la myogenèse, les myoblastes vont fusionner entre eux, suite à un ensemble de changements biochimiques. La formation de syncytiums multinucléés va ainsi aboutir à la formation de myotubes qui correspondent aux cellules musculaires différenciées. La différenciation musculaire s'accompagne de différents changements aussi bien au niveau morphologique qu'au niveau de la régulation de l'expression génétique (Shi X. et Garry DJ., 2006).

En effet, cette régulation de l'expression génique est fondamentale pour la plupart des activités biologiques. Plusieurs niveaux de régulation existent pour contrôler les différentes étapes de l'expression des gènes chez les eucaryotes. La plupart des mécanismes de régulation s'opèrent au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel.

Enfin l'acquisition de l'activité contractile constitue l'une des propriétés de la fibre musculaire.

La différenciation myogénique du muscle squelettique implique de nombreux remaniements aussi bien au niveau de la morphologie de la cellule, de l'architecture intracellulaire que du profil d'expression génique. En effet, lors de la différenciation terminale des myoblastes en myotubes, la réorganisation des microtubules (MTs) participe notamment à la formation de filaments de plus ou moins grosses épaisseurs qui vont constituer les futurs sarcomères (Warren, 1968 ; Goldstein et Entman, 1979). Les changements morphologiques de la cellule lors de la myogenèse sont liés notamment à une réorganisation drastique du réseau de microtubules (Tassin et al., 1985, Musa et al., 2003 ; Bugnard et al., 2005).

2.1 Adhésion et motilité cellulaire

a) **Adhésion**

L'adhésion des cellules implique généralement des protéines transmembranaires. Ces protéines sont souvent des récepteurs. Les protéines d'adhérence transmembranaires se prolongent à travers la membrane cellulaire et ont typiquement des domaines qui avancent à la fois dans l'espace extracellulaire et

dans le cytoplasme. Le domaine extracellulaire d'une protéine d'adhérence peut se lier à d'autres molécules qui pourraient être sur la surface d'une autre cellule (adhérence de cellule-cellule) ou d'une partie de la matrice extracellulaire (adhérence de cellule-matrice extracellulaire).

Les familles des protéines d'adhérence peuvent être caractérisées en fonction de leur structure et de leurs ligands. L'adhérence entre deux copies de la même protéine d'adhérence s'appelle lien "homophile". L'adhérence entre une protéine d'adhérence et une autre molécule s'appelle lien "hétérophile".

Il existe différentes familles de protéines impliquées dans l'adhésion comme les cadhérines, les immunoglobulines, ou encore les intégrines :

- Les cadherines sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule, en particulier la E-cadherine dans les cellules épithéliales, la N-cadherine dans les neurones et cellules musculaires, la P-cadherine dans le placenta. Le mécanisme d'adhésion homophile des cadherines est contrôlé par la concentration d'ions Ca^{2+} .

- L'adhésion portée par les Immunoglobulines (Ig) est indépendante du niveau de calcium. Les CAM, glycoprotéines transmembranaires indépendantes du calcium de la superfamille des Immunoglobulines (IgCAM) contiennent un domaine de type Ig. Beaucoup médient les interactions entre les lymphocytes et les cellules requises pour les réponses immunitaires (I-CAM par exemple), certaines IgCAM médient l'adhérence entre cellules non-immunes (V-CAM, N-CAM, L1) ou encore les liaisons avec les intégrines.

- Les intégrines sont impliquées dans la jonction des cellules à la matrice extracellulaire (MEC). C'est une famille de glycoprotéines membranaires, récepteurs de surface des cellules (Hynes RO., 1987) pour des constituants de la matrice extracellulaire. Elles se lient au collagène, à la laminine, à la fibronectine et à d'autres composants de la MEC. Les domaines de liaison extracellulaires identifient le motif RGD (Arg-Gly-Asp) et d'autres parties de glycoprotéines.

En se liant à l'intégrine, la fibronectine peut déclencher la réorganisation du cytosquelette à l'intérieur de la cellule, qui affecte la forme et la motilité des cellules (Ruoslahti E., 1984). Des cations bivalents sont requis pour maintenir les intégrines dans une conformation capable de lier le ligand.

Les intégrines jouent un rôle dans l'adhésion des myoblastes à la MEC, mais elles permettent aussi le développement des myofibrilles, par exemple dans les C2C12*, en adhérant au substrat de la MEC, ou *in vitro*, à la couche de molécules avec laquelle le plastique de culture cellulaire a été traité. Il semble donc que les intégrines jouent un rôle dans la contractilité et l'assemblage des myofibrilles les menant à devenir myofibrilles (Sparrow J. et Schöck F., 2009).

*C2C12: lignée de myoblastes de souris établie par D. Yaffe et O. Saxel en 1977, pouvant former des myotubes contractiles et produire des protéines caractéristiques du muscle squelettique.

b) Motilité

La motilité cellulaire désigne l'aptitude de la cellule à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels. La motilité de la cellule intervient dans de nombreux processus physiologiques tel que l'embryogenèse. En effet, la formation de tissus implique le déplacement et le regroupement de cellules différenciées. Ces groupes de cellules doivent ensuite former un organe et sont donc soumis à une réorganisation et une déformation d'où l'importance de l'adhésion (myogenèse, synaptogenèse).

La motilité cellulaire intervient aussi dans la cicatrisation, l'angiogenèse, l'inflammation (Laird DJ. et al., 2008). La motilité cellulaire est aussi critique lors de la réponse immunitaire, les cellules immunitaires devant se déplacer vers les corps étrangers. Un déplacement cellulaire est aussi nécessaire après une lésion, pour réparer les tissus endommagés. Elle est aussi critique lors de processus pathologiques comme la croissance tumorale et la formation de métastases (Wels J., et al 2008). La formation de métastases implique le déplacement de cellules cancéreuses à partir de la tumeur initiale.

La forme de la cellule résulte de l'organisation des trois types de filaments formant le cytosquelette: les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Le réseau de microfilaments d'actine est directement responsable des mouvements cellulaires grâce à ses propriétés de polymérisation/dépolymérisation et à ses propriétés contractiles en présence de myosine, autre protéine importante de la cellule. La cellule produit essentiellement deux types de protrusions membranaires,

le lamellipode et le filopode qui impliquent des facteurs moléculaires et des mécanismes d'association de l'actine différents.

La motilité cellulaire fait intervenir le cytosquelette d'actine assemblé en réseaux, des protéines d'adhésions (intégrines) assemblées en sites d'adhésions et des moteurs moléculaires (notamment la myosine II) assemblés en agrégats. C'est un processus en plusieurs étapes, très finement régulé au niveau spatial et temporel, chaque étape pouvant durer plusieurs secondes.

La première étape consiste en l'extension du lamellipode induite par la polymérisation d'un réseau d'actine au niveau du front cellulaire. Puis la cellule forme des sites d'adhésions à la matrice via les intégrines (Ruoslahti E. et al., 1987) suite à la génération de forces rétrogrades générées par les moteurs moléculaires (myosine II) sur ce lamellipode d'actine (Giannone et al., 2007). Il y a ensuite contraction de la cellule qui s'appuie sur les sites d'adhésions du front cellulaire de migration. Enfin, un désassemblage des sites d'adhésions à l'arrière de la cellule permet à la cellule de se déplacer vers l'avant.

La migration des cellules peut-être induite par des facteurs chimiques et/ou physiques dans le microenvironnement.

2.2 Régulation de l'expression génique

La différenciation terminale du muscle est déclenchée seulement quand les myoblastes arrêtent de proliférer. Ceci suggère que la myogenèse est régulée par des facteurs qui contrôlent la prolifération, comme par exemple, les facteurs de croissance. En effet, le FGF (Lathrop B. et al., 1985), l'EGF (Lim RW. et Hauschka SD., 1984), le TNF α (Miller SC. Et al., 1988) et le TGF β (Massague J. et al., 1986) inhibent la myogenèse. Ces facteurs de croissance sont responsables de l'inhibition de l'expression ou de l'activité des membres de la famille MYOD, soit en modifiant ces protéines, soit en stimulant les inhibiteurs de la myogenèse comme c-JUN ou c-FOS, ou les protéines ID. Il a été montré, de plus, qu'IGF-I et IGF-II stimulent à la fois la prolifération et la différenciation musculaire (Florini JR. Et al., 1996).

Durant les étapes précoces de la différenciation musculaire, les facteurs myogéniques ne sont pas seulement nécessaires à l'induction des gènes spécifiques du muscle, mais aussi à la régulation de la transition prolifération/différenciation. Ces facteurs de régulation musculaire sont nommés MRFs et sont constitués de quatre membres MYOD, MYF5, MRF4, et la Myogénine, fréquemment référencés comme facteurs musculaires à domaine bHLH pour Basic-Helix-Loop-Helix (Weintraub H. et al., 1991). L'expression de deux MRFs, MYOD et de MYF5, permet la sortie du cycle cellulaire. En effet, la surexpression des membres de la famille MYOD bloque l'entrée dans le cycle cellulaire, mimant l'arrêt de la prolifération observé durant la différenciation terminale (Sorrentino V. et al., 1990).

La protéine MYOD est exprimée dans les myoblastes en prolifération. Une fois que le stimulus de différenciation déclenche son activation, MYOD va, d'une part, provoquer l'arrêt du cycle, et d'autre part, déclencher une cascade d'activation de gènes spécifiques du muscle. Ces deux fonctions de MYOD, bien qu'étroitement coordonnées, sont contrôlées par des mécanismes distincts, MYOD pouvant induire l'arrêt du cycle même dans des cellules non permissives à la différenciation (Sorrentino V. et al., 1990).

Les bHLHs myogéniques bloquent la progression du cycle cellulaire par l'activation de gènes inhibiteurs de la prolifération cellulaire comme P21 (Halevy O. et al., 1995), la Cycline D3 (Cenciarelli C. et al., 1999) ou encore RB (Bergstrom DA. et al., 2002). Il a été montré, par exemple, que MYOD et la Myogénine se lient au promoteur du gène *c-FOS* au début de la différenciation musculaire (Trouche D. et al., 1995 ; Groisman R. et al., 1996). MYOD et MYF5 sont eux-mêmes soumis à des régulations spécifiques du cycle cellulaire. Les cellules entrent en différenciation en phase G1, au moment où l'activation de MYOD est maximale et où l'activité de MYF5 est minimale.

En parallèle de l'activation de certains gènes, il semble que MYOD puisse contribuer à inhiber l'expression d'autres gènes, comme le *FGF12*, le *TGFβ*, et la Myogénine dans certaines conditions (Bergstrom DA. et al., 2002 ; Mal A. et Harter ML., 2003). Ceci signifierait que MYOD est capable de jouer un rôle d'activateur, de manière directe ou indirecte, au niveau de certains gènes.

Simultanément à l'arrêt du cycle, MYOD active l'expression d'autres acteurs importants de la différenciation comme la Myogénine, MEF2A et MEF2D (Black BL.

et Olson EN., 1998 ; Hollenberg SM. et al., 1993 ; Edmonson DG. et al., 1992). La Myogénine intervient en aval de MYOD dans le processus de différenciation. Elle peut elle aussi assurer l'activation des gènes de la famille MEF2 (Cserjesi P. et Olson EN., 1991). Quant aux membres de la famille MEF2, ils jouent notamment un rôle de coactivateurs pour les MRFs. Leur activation ainsi que celle de la Myogénine permettrait de prendre le relais de MYOD et de contribuer à la reprogrammation transcriptionnelle des noyaux des myoblastes en cours de différenciation.

Plus tard dans la différenciation, MYOD participe à l'activation de gènes codant des protéines fonctionnelles du muscle comme la MCK, la Troponine I ou la chaîne lourde de la Myosine (MHC pour Myosin Heavy Chain) qui sont indispensables à la structure et au fonctionnement des myotubes (Bergstrom DA. et al., 2002). MYOD semble également intervenir dans l'expression de gènes codant des protéines d'adhésion, et de certains intermédiaires des voies de transduction des signaux comme le gène codant pour l'Acétylcholine (Wang Z. et al., 2003)

2.3 Mécanismes post-transcriptionnels

La différenciation musculaire se traduit par un arrêt quasi-total de la transcription et du cycle cellulaire. En effet, quand les myoblastes entrent dans leur programme de différenciation, ils ne répondent plus aux signaux mitotiques (Walsh K. et Perlman H., 1997). Un exemple de dérégulation de la balance prolifération/différenciation du système musculaire sont les cellules de rhabdomyosarcomes. Leur phénotype suggère qu'elles dérivent de progéniteurs musculaires déterminés qui se sont arrêtés à une étape précoce de la différenciation à cause d'une dérégulation de la croissance cellulaire (Dagher R. et Helman L., 1999)

En conditions de croissance, les myoblastes prolifèrent et n'expriment pas les marqueurs myogéniques de la différenciation. En privation de facteurs de croissance, les myoblastes induisent irréversiblement l'expression de la myogénine, marqueur précoce de la différenciation. En parallèle de l'expression de la myogénine, l'inhibiteur de CDK, la protéine P21, est activée (Zhang P. et al., 1999). A ce stade, la

cellule est incapable de synthétiser de l'ADN. Cette sortie du cycle cellulaire est alors irréversible (Andres V. et Walsh K., 1996). Commence alors l'expression de protéines spécifiques du muscle contractile, telles que MHC, dans ces cellules qui fusionnent entre elles et forment des myotubes multinucléés. Au cours de ce changement morphologique, le noyau de la cellule rétrécit, ce qui entraîne une compaction de la chromatine. La chromatine, ainsi compactée, ne permet plus une transcription active des gènes. De plus, les petits noyaux condensés de ces cellules vont migrer à la périphérie du myotube pour laisser la place à la formation du sarcomère, avec la formation de chaînes de microfibrilles composées en majorité de Myosine, de Tropomyosine, de Troponine et d'Actine. Le noyau est donc localisé à la périphérie de la cellule, loin du lieu de traduction active de toutes ces protéines. Il existe donc des mécanismes post-transcriptionnels de régulation de la traduction de toutes les protéines utiles à la formation du muscle, alors que la transcription est arrêtée. Ces mécanismes sont possibles grâce à la localisation et la traduction des ARN sur le lieu d'utilisation de la protéine qu'ils codent.

3) Localisation de l'ARN au cours du développement

La localisation cytoplasmique de l'ARN est un mécanisme très conservé qui permet la polarisation de l'information génétique lors de l'établissement d'asymétries comme c'est le cas au cours du développement embryonnaire. Cette distribution asymétrique des ARN joue un rôle fondamental comme cela a été déjà montré chez la Drosophile, le Xénope et *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la Drosophile, la répartition asymétrique dans le cytoplasme de l'ARN de *gurken* régit en partie l'établissement des axes antéro-postérieurs et ventro-dorsaux de l'œuf et de l'embryon (Bashirullah A. al., 1998). L'orientation de l'axe dorso-ventral chez le Xénope, mis en place lors de l'induction du mésoderme, est dirigé en partie par la distribution non symétrique d'ARN codant des facteurs de croissance comme TGF β et VG1 (Bashirullah A. et al., 1998). La localisation d'ARNs dans des régions spécifiques du cytoplasme programme aussi le devenir asymétrique de cellules au cours de la neurogenèse chez la Drosophile.

La plupart des ARN répartis de manière spécifique dans le cytoplasme, sont dirigés vers leur destination finale notamment grâce à des éléments agissant en *cis* qui généralement résident dans les régions 3' non traduites (UTR) des transcrits. Néanmoins, certains facteurs ayant une action en *trans* sont impliqués également dans les phénomènes de localisation de l'ARN. En effet, la régionalisation des ARN ou leur transport vers des régions particulières de la cellule peuvent faire intervenir des protéines chaperonnes liant l'ARN messager (ARNm).

4) Protéines se liant à l'ARNm

4.1 Généralités

Chez les métazoaires, le modèle de la *Drosophila* fournit l'exemple de la protéine liant l'ARN Staufen (Van Eeden F. et al., 1999) qui interagit avec l'ARN bicoid, ARN impliqué dans la détermination du pôle antérieur de l'œuf. Chez les mammifères, il existe plusieurs exemples de localisation asymétrique de l'ARN dans des cellules de cerveau en différenciation terminale. La distribution de l'ARNm de la myéline dans les oligodendrocytes semble être dépendant de la liaison de sa région 3'UTR avec la ribonucléoprotéine HnRNP A2 (Hoek et al., 1994).

Une des caractéristiques de ce mécanisme de liaison à l'ARNm est la capacité de transporter l'ARN sous sa forme réprimée et ainsi permettre une synthèse protéique localisée. Finalement, la formation de ces complexes ribonucléoprotéiques va jouer un rôle de régulation dans des événements comme la traduction mais aussi dans la stabilité des transcrits.

La différenciation musculaire (*in vivo* et *in vitro*) se traduit par des changements importants dans la structure et la fonction d'un myoblaste. Les cellules myogéniques *in vivo* sont caractérisées par une prolifération très rapide et une activité transcriptionnelle élevée. Par contre, les myofibres matures (fibres musculaires) possèdent de petits noyaux périphériques avec une chromatine compacte et inactive, signe d'un arrêt irréversible de la mitose. En conséquence, la quantité d'ARN messager (ARNm) total diminue, suite à l'arrêt presque complet de la transcription.

Néanmoins, la synthèse des protéines de maintenance, telles que l'Actine et la Myosine, continue dans les fibres post-mitotiques.

La quantité d'ARNm diminuant au cours de la différenciation, on peut penser qu'il y a une stabilisation des ARNm par le biais, notamment, de protéines chaperonnes de l'ARNm qui prévient leurs dégradations. Nous nous sommes intéressés récemment à l'une d'elles, LIN-28.

4.2 La protéine LIN-28

LIN-28 a été caractérisée en tant que protéine impliquée dans la régulation du développement chez *C.elegans* et dont l'expression est régulée par des microRNAs (Moss EG. et al., 1997). La fonction et le mécanisme d'action de LIN-28 ne sont pas encore bien compris. Exprimée chez les Mammifères au stade embryonnaire dans de nombreux tissus et dans des cellules de carcinomes embryonnaires, LIN-28 disparaît au stade adulte, sauf dans les muscles squelettiques et cardiaques (Yang DH. et Moss EG., 2003).

Nous avons récemment caractérisé la protéine LIN-28, comme «enhancer de la traduction», dont l'induction est indispensable à la différenciation myogénique. En utilisant une approche protéomique, nous avons montré que LIN-28, protéine se liant à l'ARN, interagit avec le complexe d'initiation de la traduction (EIF3 β), et se lie aux polysomes, augmentant ainsi la synthèse protéique des ARNm cibles. Il augmente notamment l'efficacité de la traduction de l'ARN *d'Igf-2*, facteur de croissance fœtal indispensable à la différenciation des myoblastes (Poleskaya A. et al., 2007).

4.3 Insulin-like growth factor (IGF-II)

L'insuline-like growth factor (IGF-II) est un facteur de croissance fœtal pour lequel l'expression du gène est soumise à l'empreinte parentale. IGF-II est un polypeptide de 67 acides aminés important dans l'embryogenèse et le développement. Son absence chez la souris se traduit par un phénotype de petite

taille de l'animal bien que la descendance présente un aspect normal (DeChiara TM. et al., 1991).

Chez l'Homme, le gène *IGF-II* a son expression contrôlée par trois promoteurs différents et ceci se manifeste par la production de transcrits de différentes tailles. Les transcrits primaires possèdent tous la même séquence codante ainsi qu'une même région 3'UTR identique, mais une extrémité 5'UTR différente.

La présence de variabilités entre les régions 5'UTR expliquerait la différence de régulation post-transcriptionnelle existante pour ces deux ARNm. En effet, un ARNm de 4.8-kilobases associé avec des polysomes, est transcrit de manière constitutive et est impliqué dans la synthèse du prépropeptide IGF-II. Alors que l'autre ARNm de 6.0 kb (appelé leader 3) prédominant, présente une région 5'UTR de 1.1 kb très riche en cystéine et n'est quant à lui pas traduit, et est séquestré dans un complexe RNP de taille 100S (Nielsen FC. et al., 1990).

Nous continuons donc de caractériser les partenaires de LIN-28 dans la régulation traductionnelle de la différenciation myogénique terminale *in vivo* et *in vitro*. L'accent est mis sur les protéines se liant à l'ARNm, comme les protéines de la famille IMP (IGF-II mRNA-binding proteins), dont la fonction récemment démontrée semble être de transporter les ARNm vers des zones bien précises dans la cellule (Nielsen FC. et al., 2002).

4.4 IMPs : insulin-growth factor II mRNA binding protein

Les protéines qui lient l'ARNm, présente plusieurs domaines caractéristiques. Il existe un ou plusieurs domaines de reconnaissance de l'ARNm (RRM) qui assurent soit une forte spécificité de liaison à de l'ARN simple brin soit la liaison simultanée de plusieurs molécules d'ARN. Un autre motif impliqué dans la liaison à l'ARN a été identifié dans la structure de ces protéines : le domaine d'homologie à la protéine HnRNP K (KH). Ces séquences KH correspondent à des domaines hétérogènes

homologues à des ribonucleoprotéines nucléaires. Ces motifs sont constitués d'environ 70 acides aminés et peuvent interagir de manières coordonnées ou indépendantes avec des régions de l'ARNm riche en nucléotides AU (Deshler JO. et al., 1998).

Les Insulin-like growth factor-II mRNA binding proteins (IMPs) appartiennent à cette catégorie de protéines se liant l'ARNm. En effet, cette famille regroupe trois membres IMP-1, IMP-2 et IMP-3 qui présentent d'une part, deux domaines RRM au niveau amino terminale et quatre motifs KH situés au niveau de l'extrémité carboxy terminale (Nielsen J. et al., 1999). Ces protéines ont été montrées comme interagissant avec l'ARNm leader 3 du gène *Igf-II*. Par cette interaction, les IMPs vont ainsi inhiber la traduction de l'ARNm leader 3 au cours du développement chez les Mammifères (Nielsen J. et al., 1999).

IMP-3 est l'orthologue chez le Xénope de la protéine Vg1-RBP (Vg1 mRNA Binding Protein, aussi appelée Vera) qui médie la localisation de son propre ARN vers le pôle végétatif de l'ovocyte lors de sa maturation. IMP-1 est l'orthologue chez le poulet de ZBP-1 qui participe à la localisation de l'ARNm de l'Actine (Ross AF. et al., 1997) requis pour la formation des lamellipodes dans les cellules en mouvement (Deshler JO. et al., 1998 ; Havin et al., 1998). De plus, IMP-1 (ou CRD-BP1 pour c-myc coding region determinant binding protein 1) présente une région d'homologie avec la protéine c-MYC chez la souris dont une des fonctions est la stabilisation de l'ARNm *c-Myc* (Doyle GA. et al., 1998). IMP-3 est aussi appelée KOC pour KH domain containing overexpressed in cancer chez l'homme et chez la souris (Mueller F. et al., 2003).

4.5 Rôles putatifs des IMPs dans le développement et la tumorigenèse

Les IMPs sont considérées comme des protéines onco-fœtales, c'est-à-dire des facteurs qui agissent au cours de l'embryogenèse de manière normale, mais qui peuvent être dérégulées dans les processus cancérigènes. Chez la souris, les IMPs

sont très fortement exprimées au douzième jour de l'embryogenèse, puis leur concentration va progressivement diminuer jusqu' à la naissance. Leur expression reste confinée essentiellement au niveau des tissus d'origines méso et endodermiques comme les épithéliums, le muscle et le placenta. Au niveau cellulaire, elles sont essentiellement localisées au niveau du cytoplasme et plus précisément au niveau de régions péri-nucléaires (Nielsen J. et al., 1999). Bien que les IMPs soient exprimées au cours du développement embryonnaire dans un contexte cellulaire sain, les homologues humains de ces protéines sont retrouvés surexprimés dans grands nombres de cancers (Yaniv K. et al., 2001). Bien que les rôles de ces protéines dans les néoplasies ne soient pas encore connus, il est suggéré que ces protéines très conservées, appelées VICKZ par certains groupes, seraient impliquées dans la motilité cellulaire, caractéristique des métastases (Yisraeli JK., 2005).

Les IMPs se lient de manière spécifique à l'ARNm leader 3 *Igf-2* et entraînent par la suite la répression de la traduction de cet ARNm (Nielsen J. et al., 1999). Néanmoins, les trois homologues humains sont exprimés dans les rhabdomyosarcomes (RMS) dans lesquels la traduction de l'ARNm leader 3 *Igf-2* est positivement corrélée avec leur prolifération. Les IMPs se retrouvent aussi fortement exprimées dans d'autres types de cancers comme le cancer du sein, le cancer du poumon ou encore le cancer des testicules (Zhang JY. et al., 2003 , Findeis-Hosey JJ. et al., 2010, Hammer NA. et al., 2005). IMP-3 est d'ailleurs, de plus en plus utilisé comme marqueur immuno-histologique de la progression de plusieurs cancers (Pryor et al., 2008 ; Schaeffer DF. et al., 2010).

Les fonctions d'IMP-1 et d'IMP-3 ont déjà été étudiées dans différentes lignées cancéreuses, et bien qu'IMP-2 soit le membre dont l'expression est la plus ubiquitaire, aucune information à ce jour concernant la fonction d'IMP-2 dans un contexte cancéreux n'est connue.

5) Interférence à l'ARN (RNAi)

5.1 Découverte

Depuis sa découverte dans le pétunia en 1990 par l'équipe de Jorgensen, le processus d'interférence ARN a été largement étudié et décrit (Napoli C. et al., 1990). Il permet l'extinction spécifique de gènes dont la séquence ARN est complémentaire à celle des ARN interférents. Chez la plante, où ce mécanisme a été initialement découvert, il serait impliqué dans la défense contre les ARN viraux. Ce mécanisme existe aussi dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes. Dans les cellules de mammifères, il joue de plus un rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux gènes endogènes. Il peut également être déclenché artificiellement par l'introduction dans les cellules de petits ARN double-brin, communément appelés siARN (ou siRNA1).

5.2 Mécanisme

Tuschl et ses collaborateurs ont démontré que l'interférence ARN était médiée par de petites molécules d'ARN double-brin (ARNdb) de 21 à 23 nucléotides (Tuschl T. et al., 1999 ; Zamore PD. et al., 2000 ; Elbashir SM. et al., 2001). Les microARN ou miRNA sont de petits ARNdb endogènes, obtenus par clivage, par l'enzyme Drosha, d'ARNm formant une structure en épingle à cheveux. Le pre-miRNA obtenu est alors transporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5, puis à son tour clivé par l'enzyme Dicer en un ARNdb de 21 à 23 paires de bases possédant deux nucléotides débordant à ses extrémités 3'OH. Le brin antisens de cet ARN est alors pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et reconnaît la séquence complémentaire sur l'ARNm. Cela peut aboutir à l'inhibition de la traduction (en particulier s'il existe des mésappariements entre l'ARN antisens et l'ARNm), ou au clivage de l'ARNm cible.

Le mécanisme d'interférence ARN peut aussi être déclenché artificiellement par l'introduction dans le noyau de plasmides exprimant un shRNA (short hairpin RNA) mimant les pré-microRNA, ou par l'introduction dans le cytoplasme de siARN (small interfering RNA) qui déclenchent directement le clivage d'un ARNm par Dicer en ARN antisens intégrables à leur tour dans RISC (De Fougerolles A. et al., 2007).

Ces petits ARN exogènes utilisent la voie des micro-RNA et permettent de réprimer artificiellement l'expression de n'importe quel gène cible. Ils constituent donc un potentiel outil thérapeutique dans de très nombreuses pathologies, mais aussi un outil de grande valeur pour l'étude de la fonction des gènes.

Dans notre laboratoire, les siARN sont couramment utilisés pour tester les effets de l'inhibition d'un gène *in vivo*, ou bien sur des lignées cellulaires que sur des cellules primaires.

BIBLIOGRAPHIE

A

Andrés V, Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.* 1996 Feb;132(4):657-66.

Asch BB, Medina D, Brinkley BR. Microtubules and actin-containing filaments of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1979 Mar;39(3):893-907.

B

Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:335-94. Review.

Bergstrom DA, Penn BH, Strand A, Perry RL, Rudnicki MA, Tapscott SJ. Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol Cell.* 2002 Mar;9(3):587-600.

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:167-96. Review.

Borden KL, Freemont PS. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol.* 1996 Jun;6(3):395-401. Review.

Braun A, Bordoy R, Stanchi F, Moser M, Kostka G G, Ehler E, Brandau O, Fässler R. PINCH-2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions. *Exp Cell Res.* 2003 Apr 1;284(2):239-50.

Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2005 Jan;60(1):1-13.

C

Cenciarelli C, De Santa F, Puri PL, Mattei E, Ricci L, Bucci F, Felsani A, Caruso M. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):5203-17.

Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995 Nov;20(11):465-70.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007 Jun 14;447(7146):823-8. Epub 2007 May 16.

Christiansen J, Kolte AM, Hansen TO, Nielsen FC.

IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2009 Nov;43(5):187-95. Epub 2009 May 8.

Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciote R, Van de Ven WJ, Petit MM. HMGA2 regulates transcription of the IMP-2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res.* 2007 Apr;5(4):363-72.

Cserjesi P, Olson EN. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol Cell Biol.* 1991 Oct;11(10):4854-62.

D

Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist.* 1999;4(1):34-44.

DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 1991 Feb 22;64(4):849-59.

De Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Jun;6(6):443-53

De Hoog CL, Foster LJ, Mann M. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell.* 2004 May 28;117(5):649-62.

Deshler JO, Highett MI, Abramson T, Schnapp BJ. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol.* 1998 Apr 23;8(9):489-96.

Doyle GA, Betz NA, Leeds PF, Fleisig AJ, Prokipcak RD, Ross J. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 1998 Nov 15;26(22):5036-44.

Duquet A, Polesskaya A, Cuvellier S, Ait-Si-Ali S, Héry P, Pritchard LL, Gerard M, Harel-Bellan A. Acetylation is important for MyoD function in adult mice. *EMBO Rep.* 2006 Nov;7(11):1140-6. Epub 2006 Oct 6.

E

Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol.* 1992 Sep;12(9):3665-77.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):494-8.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001 Jan 15;15(2):188-200.

F

Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, Wang HL, Xu H. IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2010 Apr;41(4):477-84. Epub 2009 Dec 11.

Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev.* 1996 Oct;17(5):481-517. Review.

Freemont PS. RING for destruction? *Curr Biol.* 2000 Jan 27;10(2):R84-7. Review.

G

Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, Beaver W, Döbereiner HG, Freund Y, Borisy G, Sheetz MP. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell.* 2007 Feb 9;128(3):561-75.

Goldstein MA, Entman ML. Microtubules in mammalian heart muscle. *J Cell Biol.* 1979 Jan;80(1):183-95.

Groisman R, Masutani H, Leibovitch MP, Robin P, Soudant I, Trouche D, Harel-Bellan A. Physical interaction between the mitogen-responsive serum response factor and myogenic basic-helix-loop-helix proteins. *J Biol Chem.* 1996 Mar 1;271(9):5258-64.

H

Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science.* 1995 Feb 17;267(5200):1018-21.

Hammer NA, Hansen TO, Byskov AG, Rajpert-De Meyts E, Grøndahl ML, Bredkjaer HE, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. *Reproduction.* 2005 Aug;130(2):203-12.

Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Molecular and cellular biology.* " *_Mol Cell Biol._* 2004 May;24(10):4448-64.

Havin L, Git A, Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev.* 1998 Jun 1;12(11):1593-8.

Hoek KS, Kidd GJ, Carson JH, Smith R. HnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry.* 1998 May 12;37(19):7021-9.

Hollenberg SM, Cheng PF, Weintraub H. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):8028-32.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987 Feb 27;48(4):549-54.

I

Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M. In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. *Mol Cell*. 2010 Jun 2. [Epub ahead of print]

Ioannidis P, Trangas T, Dimitriadis E, Samiotaki M, Kyriazoglou I, Tsiapalis CM, Kittas C, Agnantis N, Nielsen FC, Nielsen J, Christiansen J, Pandis N. C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer*. 2001 Nov;94(4):480-4.

Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Mol Cell*. 2010 Jun 2. [Epub ahead of print]

J

Jin H, Suh MR, Han J, Yeom KH, Lee Y, Heo I, Ha M, Hyun S, Kim VN. Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. *Mol Cell Biol*. 2009 Nov;29(21):5789-99. Epub 2009 Aug 24.

Johnston M, Geoffroy MC, Sobala A, Hay R, Hutvagner G. HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell*. 2010 May;21(9):1462-9. Epub 2010 Mar 17.

K

Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int J Cancer*. 2004 Nov 10;112(3):365-75.

Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*. 2009 Jun;27(6):549-55. Erratum in: *Nat Biotechnol*. 2009 Jul;27(7):671.

L

Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):612-30. Review.

Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J*. 2004 Aug 4;23(15):3092-102.

Lathrop B, Olson E, Glaser L. Control by fibroblast growth factor of differentiation in the BC3H1 muscle cell line. J Cell Biol. 1985 May;100(5):1540-7.

Lathrop B, Thomas K, Glaser L. Control of myogenic differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position in the G1 phase of the cell cycle. J Cell Biol. 1985 Dec;101(6):2194-8.

Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. , The Journal of biological chemistry." J Biol Chem. 2005 May 6;280(18):18517-24.

Lim RW, Hauschka SD. EGF responsiveness and receptor regulation in normal and differentiation-defective mouse myoblasts. Dev Biol. 1984 Sep;105(1):48-58.

M

Mal A, Harter ML. MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):1735-9. Epub 2003 Feb 10.

Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Nov;83(21):8206-10.

Miller SC, Ito H, Blau HM, Torti FM. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. Mol Cell Biol. 1988 Jun;8(6):2295-301.

Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, Siomi MC. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in Drosophila. Nat Struct Mol Biol. 2010 Jul 18. [Epub ahead of print]

Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. Cell. 1997 Mar 7;88(5):637-46.

Mueller F, Bommer M, Lacher U, Ruhland C, Stagge V, Adler G, Gress TM, Seufferlein T. KOC is a novel molecular indicator of malignancy. Br J Cancer. 2003 Mar 10;88(5):699-701.

Musa H, Orton C, Morrison EE, Peckham M. Microtubule assembly in cultured myoblasts and myotubes following nocodazole induced microtubule depolymerisation. J Muscle Res Cell Motil. 2003;24(4-6):301-8.

N

Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. Nat Cell Biol. 2006 Mar;8(3):278-84. Epub 2006 Feb 19.

Nakatani Y, Ogryzko V. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. Methods Enzymol. 2003;370:430-44.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990 Apr;2(4):279-289.

Nielsen FC, Gammeltoft S, Christiansen J. Translational discrimination of mRNAs coding for human insulin-like growth factor II. *J Biol Chem*. 1990 Aug 15;265(23):13431-4.

Nielsen FC, Nielsen J, Christiansen J. A family of IGF-II mRNA binding proteins (IMP) involved in RNA trafficking. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2001;234:93-9. Review.

Nielsen FC, Nielsen J, Kristensen MA, Koch G, Christiansen J. Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains. *J Cell Sci*. 2002 May 15;115(Pt 10):2087-97.

Nielsen J, Adolph SK, Rajpert-De Meyts E, Lykke-Andersen J, Koch G, Christiansen J, Nielsen FC. Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP-1. *Biochem J*. 2003 Dec 1;376(Pt 2):383-91.

Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1262-70.

O

Oberman F, Rand K, Maizels Y, Rubinstein AM, Yisraeli JK. VICKZ proteins mediate cell migration via their RNA binding activity. *RNA*. 2007 Sep;13(9):1558-69. Epub 2007 Jul 24.

Oleynikov Y, Singer RH. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol*. 2003 Feb 4;13(3):199-207.

P

Polesskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, Harel-Bellan A. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev*. 2007 May 1;21(9):1125-38.

Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*. 2003 Jun 27;113(7):841-52.

Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2008 Apr;21(4):431-7. Epub 2008 Jan 18.

R

Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*. 2005 Nov;11(11):1640-7. Epub 2005 Sep 21.

Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2158-65.

Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29562-9.

Ruoslahti E. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 1984;3(1):43-51.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987 Oct 23;238(4826):491-7.

S

Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, Buczkowski AK, Chung SW, Scudamore CH, Huntsman DG, Ng SS, Owen DA. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer*. 2010 Feb 23;10:59.

Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006 Jul 1;20(13):1692-708.

Sorrentino V, Pepperkok R, Davis RL, Ansorge W, Philipson L. Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature*. 1990 Jun 28;345(6278):813-5.

Sparrow JC, Schöck F. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Apr;10(4):293-8. Epub 2009 Feb 4.

Spencer JA, Eliazer S, Ilaria RL Jr, Richardson JA, Olson EN. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol*. 2000 Aug 21;150(4):771-84.

Stanchi F, Bordoy R, Kudlacek O, Braun A, Pfeifer A, Moser M, Fässler R Consequences of loss of PINCH-2 expression in mice. *J Cell Sci*. 2005 Dec 15;118(Pt 24):5899-910. Epub 2005 Nov 29.

T

Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem and progenitor cells: Reconciling genetics and lineage. *Exp Cell Res*. 2005 Jun 10;306(2):364-72. Review

Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci*, 2007. May;98(5):629-35. Epub 2007 Mar 14. Review.

Tassin AM, Maro B, Bornens M. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol*. 1985 Jan;100(1):35-46.

Trouche D, Masutani H, Groisman R, Robin P, Lenormand JL, Harel-Bellan A. Myogenin binds to and represses c-fos promoter. *FEBS Lett*. 1995 Mar 20;361(2-3):140-4.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 Dec 15;13(24):3191-7.

V

Vainer G, Vainer-Mosse E, Pikarsky A, Shenoy SM, Oberman F, Yeffet A, Singer RH, Pikarsky E, Yisraeli JK. A role for VICKZ proteins in the progression of colorectal carcinomas: regulating lamellipodia formation. *J Pathol*. 2008 Aug;215(4):445-56.

van Eeden F, St Johnston D. The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 Aug;9(4):396-404. Review.

Viens A, Mechold U, Brouillard F, Gilbert C, Leclerc P, Ogryzko V. Analysis of human histone H2AZ deposition in vivo argues against its direct role in epigenetic templating mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(14):5325-35.

Vikesaa J, Hansen TV, Jønson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J*. 2006 Apr 5;25(7):1456-68. Epub 2006 Mar 16.

W

Walsh K, Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Oct;7(5):597-602. Review.

Wang ZZ, Washabaugh CH, Yao Y, Wang JM, Zhang L, Ontell MP, Watkins SC, Rudnicki MA, Ontell M. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in MyoD-null mice. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5161-9.

Warren RH. The effect of colchicine on myogenesis in vivo in *Rana pipiens* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J Cell Biol*. 1968 Dec;39(3):544-55.

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):761-6. Review.

Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* 2008 Mar 1;22(5):559-74.

Whipple RA, Cheung AM, Martin SS. Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Exp Cell Res.* 2007 Apr 15;313(7):1326-36.

Y

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977 Dec 22-29;270(5639):725-7.

Yang DH, Moss EG. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns.* 2003 Dec;3(6):719-26.

Yaniv K, Fainsod A, Kalcheim C, Yisraeli JK. The RNA-binding protein Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. *Development.* 2003 Dec;130(23):5649-61. Epub 2003 Oct 1.

Yaniv K, Yisraeli JK. Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization. *Int Rev Cytol.* 2001;203:521-39. Review.

Yisraeli JK. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. "Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization." *_Biol Cell._* 2005 Jan;97(1):87-96.

Z

Zákány J, Duboule D. Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.* 1999 Apr;296(1):19-25.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):25-33.

Zhang J, Chan EK. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev.* 2002 May;1(3):146-53. Review.

Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb;12(2):136-43.

Zhang JY, Chan EK, Peng XX, Tan EM. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Med.* 1999 Apr 5;189(7):1101-10.

Zhang P, Wong C, Liu D, Finegold M, Harper JW, Elledge SJ. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step "Genes & development." *_Genes Dev._* 1999 Jan 15;13(2):213-24.

Zhang Y, Chen K, Guo L, Wu C. Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38328-38.