

Corps GW et granules de stress, deux structures cytoplasmiques pour la dégradation et le stockage des ARNm dans les cellules de mammifère.

Dominique Weil

CNRS FRE2937, Institut André Lwoff, 7 rue Guy Moquet, 94801 Villejuif cedex

Auteur correspondant : Dominique Weil, weil@vjf.cnrs.fr

Reçu le 4 Décembre 2006

Résumé – Le devenir des ARNm non traduits est assez mal connu dans les cellules eucaryotes. Ils peuvent être rapidement dégradés ou stockés pour une utilisation ultérieure. Les mécanismes moléculaires de dégradation et de stockage ont parfois été étudiés en détail par des approches biochimiques. C'est le cas par exemple d'un des derniers mécanismes de régulation mis en évidence, l'interférence ARN. Mais, bien souvent, la dimension cellulaire n'a pas été prise en considération, comme si ces réactions avaient lieu de façon diffuse dans le cytoplasme. Deux nouvelles structures impliquées dans ces aspects du métabolisme des ARNm ont été décrites récemment : les corps GW (ou *P bodies*) et les granules de stress. Les premiers travaux ont laissé penser que les corps GW sont spécialisés dans la dégradation des ARNm tandis que les granules de stress sont des lieux de stockage des ARNm. Ce tableau est en train d'évoluer rapidement, avec de nombreux recouvrements de fonctions entre les deux structures.

Mots clés : dégradation des ARNm / stockage des ARNm / interférence ARN / compartimentation

Abstract – GW bodies and stress granules, two cytoplasmic structures for mRNA degradation and storage in mammalian cells.

What does mRNA become at the issue of translation in eukaryotic cells ? It can be directly degraded or stored for further use. In some cases, the underlying molecular mechanisms have been studied in detail by biochemical approaches, as exemplified by the most recently discovered regulation pathway, RNA interference. However, the cellular context of these regulations has often been ignored, as if these reactions took place diffusely throughout the cytoplasm. Two new structures involved therein have now been described : GW bodies (or P-bodies) and stress granules. The first studies suggested that they were specifically devoted to mRNA degradation and mRNA storage, respectively. This framework is changing rapidly with obvious functional overlapping between both structures.

L'expression des gènes est due au contrôle de leur transcription, mais aussi à l'efficacité de traduction de leurs ARNm. Le rendement en protéines dépend à la fois de la stabilité des ARNm, de la fréquence d'initiation de traduction et des possibilités de stockage de ces ARNm sous forme dormante. Dans des cas particuliers comme l'oeuf et les neurones, on sait que certains ARNm sont stockés dans des sites spécifiques en attente d'un signal capable de déclencher la reprise de leur traduction. Dans l'oeuf,

ce mécanisme est nécessaire pour la reprise de méiose après la fécondation. Dans les neurones, il permet la traduction sélective de certains ARNm dendritiques en réponse à l'activation d'une synapse adjacente (Aakalu *et al.*, 2001). Mais dans la plupart des cas, le devenir des ARNm non traduits reste méconnu. Deux structures cytoplasmiques récemment identifiées, les corps GW et les granules de stress, apportent des éléments de réponse. Cette dimension spatiale du métabolisme des ARNm dans le

cytoplasme doit être prise en compte pour comprendre les régulations post-transcriptionnelles en général, et l'interférence ARN en particulier.

Corps GW et granules de stress, des fonctions initialement distinctes

Corps GW et dégradation des ARNm

Dans les cellules de mammifère, la machinerie de la voie principale de dégradation des ARNm s'accumule dans de petits foyers cytoplasmiques appelés corps GW ou corps dcp (Ingelfinger *et al.*, 2002; van Dijk *et al.*, 2002). Ces corps dépourvus de membrane font 100 à 500 nm de diamètre (Fig. 1A). Ils sont présents en nombre variable dans toutes les populations cellulaires. Au cours du cycle cellulaire, ils apparaissent au cours de la phase G1, sont nombreux en phase S et G2, puis disparaissent en mitose (Yang *et al.*, 2004). Des corps similaires ont été décrits chez la levure et appelés *P-bodies* (*processing bodies*) (Sheth & Parker, 2003).

Les corps GW contiennent (i) les enzymes de *decapping* dcp1 et 2 responsables du clivage de la coiffe présente à l'extrémité 5' des ARNm, (ii) des facteurs qui stimulent le *decapping* comme rck/p54 (dhh1p chez la levure) et le complexe heptamérique LSM, et (iii) l'exonucléase Xrn1 qui hydrolyse l'ARN selon une polarité 5' 3'. Les corps GW ne sont pas des sites de stockage de ces facteurs, mais bien des corps où a lieu la dégradation d'ARNm. En effet, leur comportement dépend du flux d'ARNm à dégrader. Ils disparaissent de la cellule quand la traduction est arrêtée avec un inhibiteur comme la cycloheximide, qui fige les ARNm sous forme de polysomes. Par contre, ils grossissent et augmentent en nombre si la traduction est bloquée par la puromycine, qui dissocie les polysomes et libère les ARNm (Sheth & Parker, 2003; Wilczynska *et al.*, 2005). De plus, c'est dans ces corps que les ARNm s'accumulent lorsque leur dégradation est inhibée. C'est le cas dans des souches de levure délétées de l'exonucléase Xrn1 (Sheth & Parker, 2003) ou dans des cellules de mammifère où Xrn1 est déplétée par interférence ARN (Cougot *et al.*, 2004). Ces corps contiennent aussi des protéines de la voie du NMD (*non sense mediated decay*) qui permet d'induire la dégradation des messagers aberrants dont le codon stop est reconnu comme prématuré : SMG5, SMG7 et Upf1 (Unterholzner & Izaurralde, 2004). Ainsi, la dégradation des ARNm a lieu non pas de façon diffuse dans le cytoplasme, mais, au moins pour une part, dans les foci ribonucléoprotéiques que sont les corps GW.

Granules de stress et stockage d'ARNm

Après un stress environnemental tel que stress oxydatif, choc thermique ou irradiation U.V., les cellules traduisent sélectivement les protéines nécessaires pour la viabilité cellulaire pendant que le reste de la traduction s'arrête. Ceci s'accompagne de l'apparition de larges foci cytoplasmiques appelés granules de stress, où s'accumulent des ARNm non traduits. Ces granules, eux aussi dépourvus de membrane, sont plus gros que les corps GW et de forme irrégulière allant de un à plusieurs microns (Fig. 1B). Lorsque le stress cesse, ils disparaissent en deux ou trois heures, suggérant que les ARNm qu'ils contiennent reprennent leur traduction (Fig. 2). Ces corps sont absents chez la levure.

Les granules de stress contiennent des ARNm, les protéines de la petite sous-unité ribosomale et les facteurs d'initiation de la traduction eIF3, eIF4E, eIF4G (Kedersha *et al.*, 2002), c'est à dire la machinerie d'initiation de la traduction à l'exception de eIF2, eIF5 et de la grande sous-unité ribosomale. Il s'agit donc d'ARNm non traduits, qui pourraient être associés à un complexe de pré-initiation de la traduction abortif de type 48S, auquel il manque le complexe ternaire eIF2-GTP-tRNAi. Comme les corps GW, ces granules dépendent du flux d'ARNm, puisque leur assemblage est inhibé par la cycloheximide. Cependant la puromycine seule ne suffit pas à les induire, indiquant qu'ils nécessitent plus qu'une simple libération d'ARNm non traduits.

Outre les facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction, les granules de stress contiennent diverses protéines répresseurs de la traduction : TIA1 et TIAR (Kedersha *et al.*, 1999), la protéine responsable du syndrome du X fragile FMRP (Mazroui *et al.*, 2002), CPEB1 (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) qui contrôle la traduction de certains ARNm à la fois dans l'oeuf et dans les dendrites (Wilczynska *et al.*, 2005), Rap55 (Yang *et al.*, 2006b)... Les premières identifiées ont été TIA1 et TIAR. A elle seule, la surexpression de TIA1 conduit à l'assemblage de granules de stress. A l'inverse, dans des cellules MEF dont le gène TIA1 est inactivé, l'arsénite induit difficilement des granules de stress (Gilks *et al.*, 2004). La protéine TIA1 semblait donc avoir un rôle actif dans l'assemblage des granules de stress. Elle possède une séquence de type prion, riche en résidus glutamine, qui lui confère des propriétés d'autoagrégation. Ceci a conduit le groupe de Kedersha à proposer que l'assemblage des granules de stress soit dû à l'enchevêtrement d'ARNm via l'agrégation des protéines TIA1 qui leur sont liées, conduisant à un agrégat de très grande taille (Gilks *et al.*, 2004). Ceci

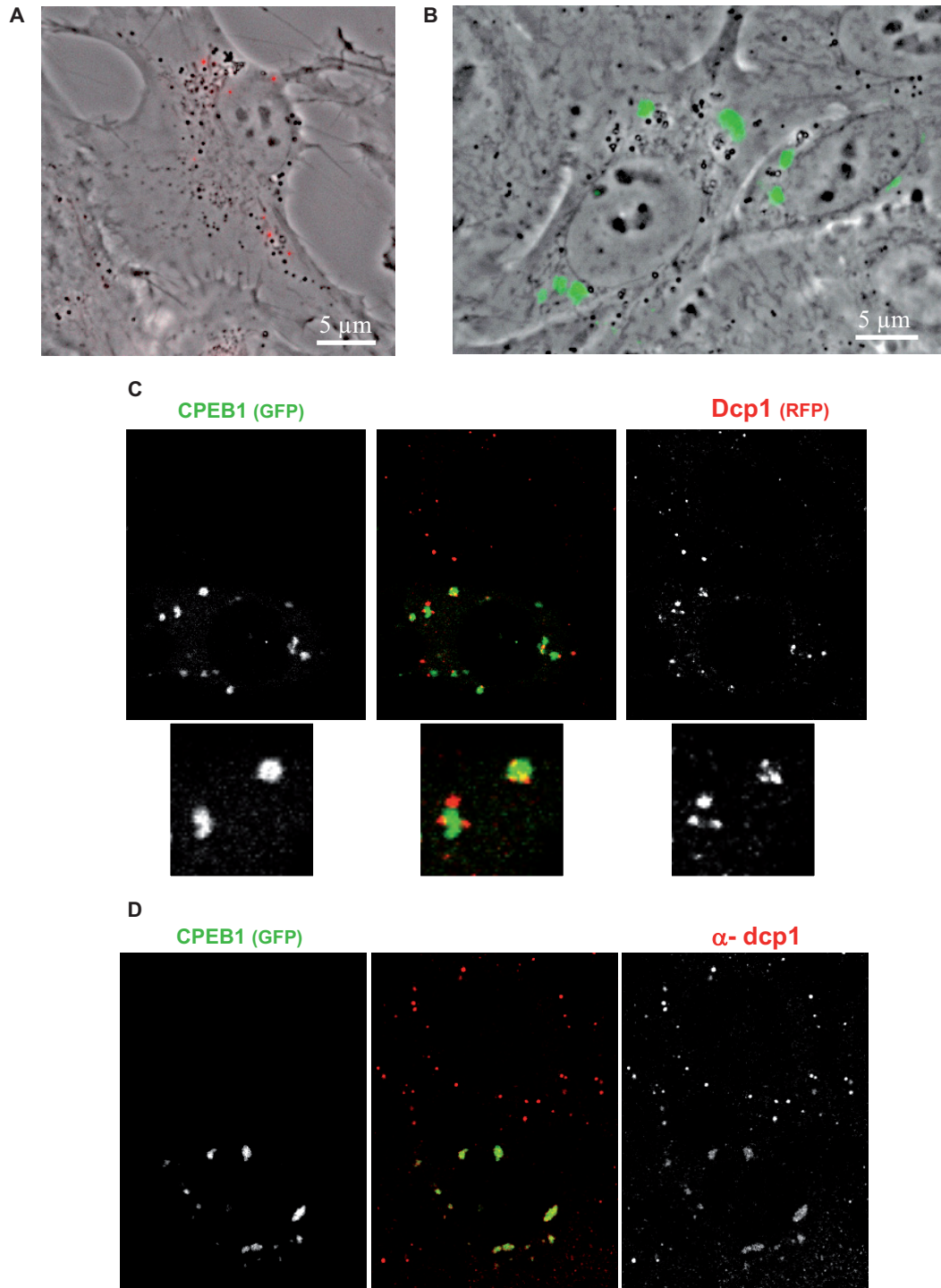


Fig. 1. Morphologie des corps GW et des granules de stress en microscopie optique. A. Corps GW dans des cellules RPE vivantes. Ils sont détectés grâce à la présence d'une protéine de fusion dcp1-RFP (rouge). B. Granules de stress dans des cellules RPE vivantes. Ils sont induits par l'expression d'une protéine de fusion CPEB1-GFP et détectés grâce à sa fluorescence (verte). C. Contacts entre corps GW et granules de stress dans des cellules HeLa. Les marqueurs CPEB1-GFP et Dcp1-RFP ont été exprimés simultanément. Un détail de l'image montrant deux granules de stress entourés de corps GW a été agrandi pour une meilleure visualisation. D. Recrutement des protéines des corps GW par les granules de stress dans des cellules HeLa. Les granules de stress sont induits et marqués par CPEB1-GFP tandis que les corps GW sont détectés par immunofluorescence avec des anticorps anti-dcp1 couplés au TRITC.

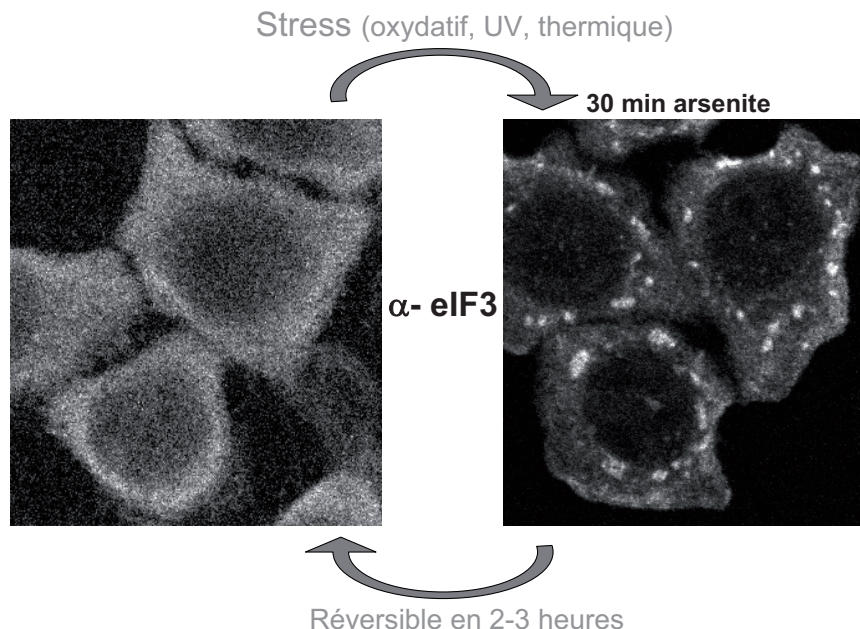


Fig. 2. Induction réversible des granules de stress. Les granules de stress sont détectés par immunofluorescence avec des anticorps anti-eIF3 dans des cellules HeLa.

est difficilement compatible avec la courte durée de vie de la protéine TIA1 dans les granules de stress : quelques secondes seulement, d'après des expériences de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) (Kedersha *et al.*, 2000). De plus, les résultats obtenus sur les MEF dont le gène TIA1 est inactivé sont controversés (F. De Leeuw, T. Zhang, G. Huez, V. Kruijs, C. Gueydan, communication à la 6ème rencontre SifrARN 2006). Enfin, plusieurs protéines des granules de stress sont maintenant connues pour induire leur assemblage : FMRP (Mazroui *et al.*, 2002), CPEB1 (Wilczynska *et al.*, 2005), G3BP (Tourriere *et al.*, 2003). Le mécanisme mis en jeu reste inconnu : répression d'ARNm cibles suffisamment nombreux pour former des granules de stress, séquestration de protéines d'initiation provoquant une inhibition générale de la traduction, induction de l'assemblage des granules de stress via une cascade de signalisation qu'il reste alors à identifier...

Mécanisme d'induction des granules de stress

Au cours de leurs études, Kedersha et Anderson ont conclu à un rôle essentiel de eIF2a dans l'induction des granules de stress. Les stress oxydatif, thermique et U.V. ont des effets multiples sur les cellules, dont la phosphorylation du facteur eIF2a. Celui-ci est alors incapable de se recharger en GTP et de recruter le tARNi sur le complexe d'initiation (Kedersha *et al.*, 2002). Cette phosphorylation de eIF2a est cruciale

pour l'induction des granules de stress. En effet, l'expression d'un mutant non phosphorylable de eIF2a (S51A) inhibe l'assemblage de granules de stress en réponse à l'arsenite (Kedersha *et al.*, 2005). A l'inverse, l'expression d'un mutant phospho-mimétique (S51D) de eIF2a suffit à induire des granules de stress en l'absence de tout autre stress. Enfin, eIF2a apparaît tardivement dans les granules de stress et pourrait jouer un rôle actif dans leur désassemblage (Kedersha *et al.*, 2002), bien que ce point soit contesté par une équipe qui détecte précocement dans les granules de stress eIF2a et eIF2B, son facteur d'échange (Kimball *et al.*, 2003).

L'assemblage des granules de stress peut aussi suivre des voies indépendantes de eIF2a. Il peut par exemple être induit par des inhibiteurs de l'initiation de la traduction qui agissent en amont de eIF2a, comme la patéamine A qui bloque eIF4A (Dang *et al.*, 2006), ou en aval de eIF2a, comme l'édéine qui inhibe la liaison de la sous-unité ribosomale 60S (Thomas *et al.*, 2005). C'est aussi le cas après traitement par des poisons mitochondriaux comme le FCCP ou l'oligomycine qui conduisent à une inhibition de la traduction secondaire à une déplétion énergétique (Kedersha *et al.*, 2002).

Les granules de stress ne sont pas seulement induits par des stress massifs comme l'arsenite, les UV ou le choc thermique. Ils sont également observés au cours d'infections par certains virus, comme le virus de la forêt de Semliki (SFV) et les réovirus, qui répriment

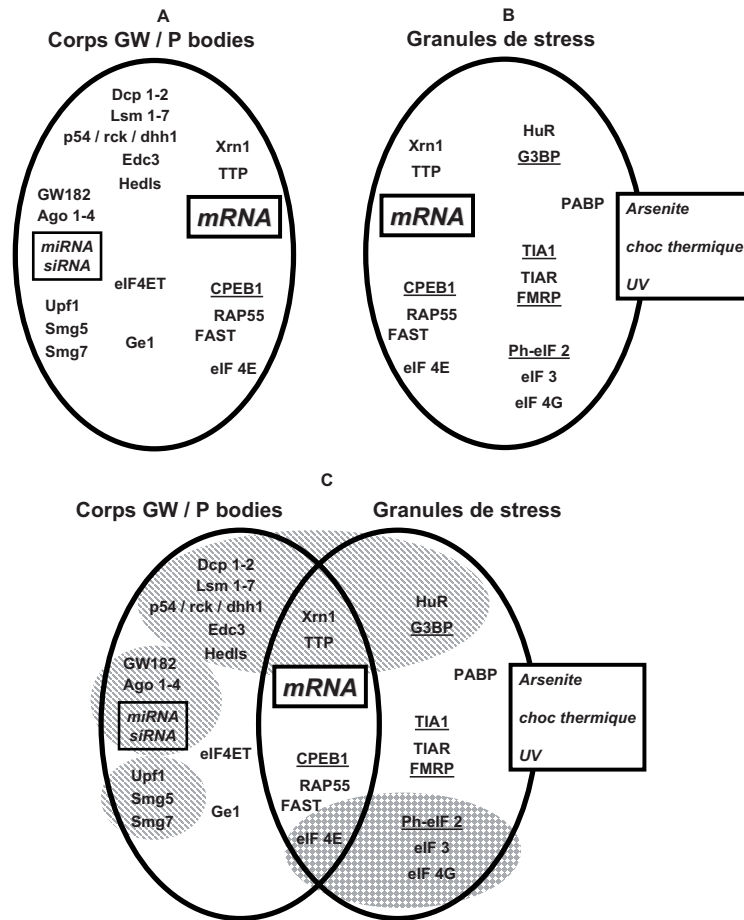


Fig. 3. Composants des corps GW et des granules de stress. A. Composants des corps GW. B. Composants des granules de stress. C. Recouvrement entre corps GW et granules de stress. Le motif à rayures obliques indique les protéines impliquées dans la dégradation, le motif de losanges la machinerie d'initiation de traduction, et le grillage les répresseurs de la traduction.

tous les deux la traduction cellulaire via la phosphorylation de eIF2a (McInerney *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006). De plus, ils sont observables *in vivo*. Chez le rat, l'insertion d'électrodes dans l'hippocampe conduit à l'apparition de granules de stress qui disparaissent après 30 minutes (Kim *et al.*, 2006). De même, une brève ischémie du cerveau entraîne l'apparition de granules de stress dans l'hippocampe qui disparaissent au cours des heures suivant la reperfusion (Kayali *et al.*, 2005).

Corps GW et granules de stress, des fonctions mixtes

Corps GW et stockage d'ARNm

Outre la machinerie de dégradation, les corps GW contiennent aussi des répresseurs de la traduction :

p54/rck, CPEB1, RAP55, eIF4ET... (Fig. 3A). La protéine p54/rck mentionnée ci-dessus comme cofacteur de l'enzyme de décapage *dcpl* est aussi impliquée dans le stockage des ARNm maternels dans l'ovocyte (Minshall *et al.*, 2001). Il a été montré chez le Xénope qu'elle est liée à la protéine CPEB1 au sein d'un complexe qui réprime la traduction de certains ARNm maternels en se fixant sur des séquences spécifiques présentes dans leur extrémité 3' non traduite. Récemment, il est apparu que RAP55 appartient aussi à un complexe répresseur contenant p54 (Tanaka *et al.*, 2006). Quant à eIF4ET, il inhibe l'initiation de la traduction en interagissant avec eIF4E sur l'extrémité cappée des ARNm (Ferraiuolo *et al.*, 2005).

La présence de ces protéines dans les corps GW établit un lien entre répression de la traduction et dégradation des ARNm, qui reste pour l'instant assez flou. Ces facteurs pourraient avoir un rôle actif dans

le ciblage des ARNm sur lesquels ils sont fixés vers ces corps. On peut imaginer par exemple qu'une protéine comme p54 permet un couplage entre la répression de la traduction - via un complexe protéique fixé du côté 3' de l'ARNm auquel elle appartient - et la dégradation - via son interaction directe avec l'enzyme de *decapping* dcp1 du côté 5' (Coller *et al.*, 2001). Alternativement, ces protéines pourraient suivre passivement les ARNm une fois qu'ils sortent des polysomes. C'est le cas lorsqu'une protéine MS2-GFP est utilisée comme étiquette fluorescente pour visualiser un ARNm dans les corps GW, il est clair qu'elle n'y joue aucun rôle (Sheth & Parker, 2003). De plus, après avoir pensé que la présence d'ARNm non traduits dans les corps GW n'était qu'un prélude à leur dégradation, il apparaît maintenant que ces corps peuvent aussi être des sites de stockage. Ceci a d'abord été démontré chez la levure, où une privation en glucose conduit rapidement à un arrêt général de la traduction associé à l'accumulation d'ARNm dans les P bodies. Ces ARNm peuvent en ressortir et s'associer à nouveau en polysomes après addition de glucose (Bregues *et al.*, 2005). Comme la levure ne possède pas de granules de stress, les P-bodies remplissent ici la double fonction de dégradation et stockage des ARNm. Des arguments similaires viennent d'être apportés dans le cas des cellules de mammifère dans le contexte de l'interférence ARN détaillé ci-dessous.

Corps GW et interférence ARN par des siARN et des micro-ARN

Les corps GW sont impliqués dans l'interférence ARN. Ce mécanisme de régulation peut être considéré comme un cas particulier de dégradation des ARNm ou de répression de la traduction selon qu'il est guidé par un petit ARN interférent (siARN) ou un micro-ARN (miARN). Tout d'abord, les éléments clé de la machinerie d'interférence s'accumulent dans ces corps (Fig. 3A) : siRNA, miRNA et protéines argonaute du complexe RISC Ago1 à 4 (Liu *et al.*, 2005b; Pillai *et al.*, 2005; Sen & Blau, 2005). La protéine GW182 qui a donné son nom à ces corps est initialement un auto-antigène fréquemment présent dans des sérums de patients atteints de cirrhose biliaire primitive (Eystathioy *et al.*, 2002). Récemment, il s'est avéré qu'elle jouait un rôle important dans l'interférence. Dans les cellules de mammifère, elle est présente dans les complexes contenant les protéines Ago 1 et 2 et nécessaire pour l'activité d'interférence. Ainsi, un gène rapporteur réprimé par un siARN ou un miARN se trouve partiellement dérprimé lorsque l'expression de GW182 est inhibée par interférence ARN (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005a). Chez la drosophile, GW182 semble surtout

nécessaire pour l'activité miARN (Rehwinkel *et al.*, 2005). Les enzymes de *decapping* dcp1 et 2 présentes dans les corps GW sont aussi associées aux protéines Ago et nécessaires à l'interférence guidée par des siARN comme par des miARN (Liu *et al.*, 2005a; Rehwinkel *et al.*, 2005). Dans le cas des siARN, on sait que la molécule d'ARN 5'OH générée par le clivage est décappée puis dégradée par la machinerie de dégradation 5'-3' (Orban & Izaurralde, 2005). Dans le cas des miARN, le rôle de dcp n'est pas élucidé. Enfin, la protéine p54/rck est également associée au complexe RISC et nécessaire pour l'interférence guidée par un miARN. Curieusement, alors qu'elle pourrait stimuler le *decapping*, elle n'intervient pas lorsque l'interférence est induite par un siARN (Chu & Rana, 2006).

La présence dans des corps de dégradation du complexe RISC associé à un miARN, qui conduit à la répression de la traduction sans clivage, s'explique grâce à des données récentes. D'une part, dans certaines cellules, la répression par un miARN s'accompagne d'une déstabilisation de l'ARNm qui implique la voie de dégradation générale (Schmitter *et al.*, 2006). D'autre part, les corps GW peuvent stocker des ARNm réprimés par un miARN sans les dégrader. Ceci vient d'être démontré dans des cellules d'hépatome Huh7 (Bhattacharyya *et al.*, 2006). L'ARNm du transporteur des acides aminés cationiques CAT1 y est normalement réprimé par le miARN miR122 et localisé dans les corps GW. Après une privation en acides aminés, la traduction de ce transporteur devient nécessaire, son ARNm disparaît des corps GW et réapparaît dans les polysomes.

Granules de stress et stabilité des ARNm

En plus des protéines impliquées dans l'initiation de la traduction et le stockage des ARNm, les granules de stress contiennent des protéines impliquées dans la dégradation et/ou la stabilité des ARNm (Fig. 3B) : nucléases Xrn1, G3BP (Tourriere *et al.*, 2003) et PRM1 (Yang *et al.*, 2006a), PABP1 (*polyA binding protein*), TTP (tristetraproline) (Stoecklin *et al.*, 2004) et HuR (*human antigen R*) (Kedersha *et al.*, 2002)... Le rôle des nucléases dans ces granules est mystérieux. Pour l'exonucléase Xrn1, on ne connaît que sa fonction générale dans la dégradation 5'-3' des ARNm. Quant à G3BP et PRM1, ce sont des endonucléases spécifiques de certains transcrits dont le rôle est encore mal connu. G3BP est cruciale pour le développement embryonnaire (Zekri *et al.*, 2005) tandis que PRM1 est activée par les oestrogènes (Cunningham *et al.*, 2001). La protéine PABP1 couvre la queue polyA des ARNm et la protège de la digestion. Elle contribue ainsi à leur sta-

bilité, dans la mesure où le *decapping* fait généralement suite à la digestion de la queue polyA. Les protéines TTP et HuR régulent toutes deux la stabilité de messagers contenant des séquences riches en motifs AU appelées ARE (*AU-rich elements*), mais ont des effets opposés, HuR étant stabilisatrice et TTP déstabilisatrice. TTP n'apparaît dans les granules de stress que dans des conditions particulières de stress mitochondrial. En fait, les régulations par les séquences ARE sont complexes et HuR peut aussi agir en synergie avec TIA1 pour réprimer la traduction de certains messagers à séquence ARE, comme celui du TNF α (Katsanou *et al.*, 2005). Ainsi, alors que les granules de stress ont été initialement décrits comme des structures de stockage des ARNm, il est probable qu'ils peuvent jouer un rôle plus large dans le métabolisme des ARNm.

Relations entre corps GW et granules de stress

Des composants communs

La liste des protéines présentes dans les corps GW et dans les granules de stress s'allonge rapidement et il devient difficile d'en déduire une fonction claire et distincte pour ces deux structures. Globalement, les enzymes impliquées dans la dégradation des ARNm sont dans les corps GW tandis que les protéines engagées dans l'initiation de la traduction sont localisées dans les granules de stress, et les deux corps contiennent des répresseurs de la traduction. Dans le détail, certaines protéines sont autant des composants des corps GW que des granules de stress : Xrn1, TTP, eIF4E, RAP55, CPEB1... (Fig. 3C). Il est bien sûr tentant de vouloir donner une fonction à chaque protéine au sein de ces corps. Cependant, comme on l'a vu ci-dessus, il faut toujours considérer la possibilité que certaines ne s'y trouvent que parce qu'elles suivent l'ARNm sur lequel elles sont fixées. Ceci est particulièrement vrai pour les granules de stress, pour lesquels on manque cruellement d'essai fonctionnel à ce jour. Il n'est pas exclu qu'on finisse par y trouver toute protéine liant l'ARNm. On peut toutefois s'étonner qu'il n'y ait pas encore de lien établi entre interférence ARN et granules de stress. D'une part la protéine FMRP présente dans les granules de stress apparaît associée au complexe RISC dans des expériences de fractionnement biochimique (Caudy *et al.*, 2002; Ishizuka *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004). D'autre part, la déstabilisation des ARNm par les séquences ARE fait intervenir le micro-ARN miR16 et la machinerie d'interférence ARN (Jing *et al.*, 2005). La protéine TTP est associée à un complexe contenant Ago2. Elle faciliterait l'in-

teraction du complexe RISC guidé par miR16 avec les séquences ARE.

Quels que soient les recouvrements possibles entre les deux structures, on observe que chez la levure, dégradation et stockage des ARNm sont assurés par une structure unique, le P-body, celui-ci pouvant être stimulé par un stress. Au contraire, les cellules de mammifère ont développé deux structures différentes, l'une constitutive - les corps GW -, l'autre inductible par le stress - les granules de stress.

Relations physiques entre corps GW et granules de stress

Alors que corps GW et granules de stress apparaissent clairement distincts au microscope, un granule de stress étant 5 à 10 fois plus gros qu'un corps GW, ils établissent des liens physiques dans le cytoplasme. Lorsque des granules de stress sont induits par l'arsenite, le nombre de corps GW par cellule augmente notablement (Wilczynska *et al.*, 2005). L'inhibition de la traduction est en effet associée à une dissociation des polysomes. Les ARNm libérés s'accumulent dans les granules de stress mais vont aussi alimenter les corps GW. De façon inattendue, corps GW et granules de stress se retrouvent accolés, avec fréquemment plusieurs corps GW en rosette autour d'un granule de stress (Fig. 1C) (Kedersha *et al.*, 2005; Wilczynska *et al.*, 2005). Au contraire, lorsque les granules de stress sont induits par l'expression de CPEB1, les corps GW disparaissent le plus souvent, tandis que leurs composants (dcp1, p54, GW182) se relocalisent dans les granules de stress, comme s'il y avait eu fusion entre corps GW et granules de stress (Fig. 1D) (Wilczynska *et al.*, 2005). Dans les cellules où des corps GW subsistent, ils sont accolés aux granules de stress.

Les raisons du maintien ou pas de corps GW distincts restent inconnues. Cela dépend de l'inducteur utilisé, ici l'arsenite ou la surexpression de CPEB1, mais aussi du temps. Le nombre de cellules où granules de stress et corps GW sont confondus augmente progressivement entre 8 heures et 20 heures après transfection de CPEB1. Par ailleurs, il dépend des protéines en présence. Quand des granules de stress sont induits par l'arsenite dans des cellules surexprimant p54-RFP, alors corps GW et granules de stress sont fréquemment confondus. Inversement, quand ils sont induits par CPEB1 dans des cellules qui surexpriment aussi dcp1-RFP, ils restent toujours distincts. Ces observations nous ont conduits à proposer le modèle suivant (Fig. 4). Des ARNm arrivent en permanence dans les corps GW pour y être dégradés, voire stockés. Lors d'un blocage de la traduction provoqué par un stress, ou suite à la surexpression de

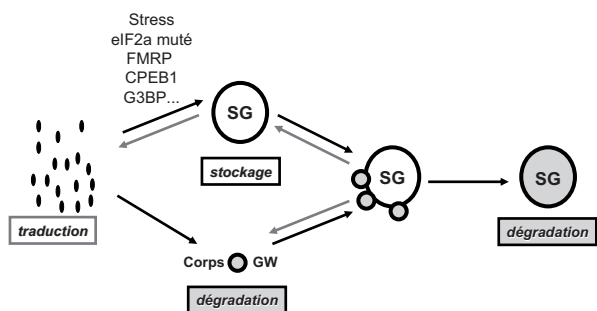


Fig. 4. Modèle proposé pour rendre compte des relations entre corps GW et granules de stress.

répresseurs de la traduction comme CPEB1 ou FMRP, les ARNm sont stockés dans des granules de stress. Si le stress disparaît, ces granules se désassemblent et les ARNm reprennent leur traduction dans les polysomes. S'il persiste, les granules de stress recrutent progressivement les corps GW et fusionnent avec eux le cas échéant. Ces contacts ou cette fusion permettrait une transition entre stockage et dégradation des ARNm (Wilczynska *et al.*, 2005).

Pour démontrer ce modèle, nous développons des outils pour étudier les corps GW et les granules de stress par vidéomicroscopie dans les cellules vivantes. Des traceurs fluorescents utilisés seuls ou en combinaison nous permettent de repérer granules de stress et corps GW (CPEB1-GFP, dcp1-RFP, p54-RFP...). Les granules de stress sont ensuite induits par l'arsénite ou par surexpression de CPEB1-GFP. Ils apparaissent étonnamment dynamiques : ils se déforment, se fragmentent et se regroupent sans cesse. D'après des expériences de FRAP, ils échangent rapidement des protéines avec le cytoplasme. On a vu plus haut, que la demi-vie de TIA1 dans les granules est de quelques secondes, c'est aussi le cas de TTP (Kedersha *et al.*, 2005). Celle de CPEB1 est d'une vingtaine de secondes (résultats non publiés), comme celle de PABP1 (Kedersha *et al.*, 2005). Leurs contacts avec les corps GW sont eux aussi dynamiques : on peut voir des corps GW quitter un granule de stress et en rejoindre un autre. Ces contacts mouvants leur offrent la possibilité d'échanger des protéines ou même des ARN. La nature et la finalité de ce trafic entre les deux structures reste à déterminer.

Références

Aakalu, G., Smith, W. B., Nguyen, N., Jiang, C. and Schuman, E. M. (2001). Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* **30**, 489-502.

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Cross, E. I. and Filipowicz, W. (2006). Relief of

microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-24.

Bregues, M., Teixeira, D. and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-9.

Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J. and Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* **16**, 2491-6.

Chu, C. Y. and Rana, T. M. (2006). Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLoS Biol.* **4**, e210.

Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A. and Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *Rna* **7**, 1717-27.

Cougot, N., Babajko, S. and Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* **165**, 31-40.

Cunningham, K. S., Hanson, M. N. and Schoenberg, D. R. (2001). Polysomal ribonuclease 1 exists in a latent form on polysomes prior to estrogen activation of mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1156-62.

Dang, Y., Kedersha, N., Low, W. K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P. and Liu, J. O. (2006). Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *J. Biol. Chem.* **281**, 32870-8.

Eystathiou, T., Chan, E. K., Tenenbaum, S. A., Keene, J. D., Griffith, K. and Fritzler, M. J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1338-51.

Ferraiuolo, M. A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E. L., Schoenberg, D. R. and Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J. Cell. Biol.* **170**, 913-24.

Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M. and Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5383-98.

Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Luhrmann, R. and Achsel, T. (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *Rna* **8**, 1489-501.

Ishizuka, A., Siomi, M. C. and Siomi, H. (2002). A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* **16**, 2497-508.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J. and Chan, E. K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1267-74.

Jin, P., Zarnescu, D. C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T. A., Nelson, D. L., Moses, K. and Warren, S. T. (2004). Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* **7**, 113-7.

- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S. C., Gram, H. and Han, J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* **120**, 623-34.
- Katsanou, V., Papadaki, O., Milatos, S., Blackshear, P. J., Anderson, P., Kollias, G. and Kontoyiannis, D. L. (2005). HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol. Cell* **19**, 777-89.
- Kayali, F., Montie, H. L., Rafols, J. A. and DeGracia, D. J. (2005). Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience* **134**, 1223-45.
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J. and Anderson, P. (2002). Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* **13**, 195-210.
- Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E. and Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **151**, 1257-68.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E. and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871-84.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**, 1431-42.
- Kim, S. H., Dong, W. K., Weiler, I. J. and Greenough, W. T. (2006). Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. *J. Neurosci.* **26**, 2413-8.
- Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S. and Harding, H. P. (2003). Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **284**, C273-84.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R. and Hannon, G. J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1261-6.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719-23.
- 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**, 3007-17.
- McInerney, G. M., Kedersha, N. L., Kaufman, R. J., Anderson, P. and Liljestrom, P. (2005). Importance of eIF2 α phosphorylation and stress granule assembly in alpha virus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3753-63.
- Minshall, N., Thom, G. and Standart, N. (2001). A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *Rna* **7**, 1728-42.
- Orban, T. I. and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna* **11**, 459-69.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-6.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1 :DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* **11**, 1640-7.
- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P. and Filipowicz, W. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acid Res.* **34**, 4801-15.
- Sen, G. L. and Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 633-6.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-8.
- Smith, J. A., Schmechel, S. C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M. G., Kaufman, R. J., Bohjanen, P. R. and Schiff, L. A. (2006). Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* **80**, 2019-33.
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F., Blackwell, T. K. and Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin :14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *Embo J.* **23**, 1313-24.
- Tanaka, K. J., Ogawa, K., Takagi, M., Imamoto, N., Matsumoto, K. and Tsujimoto, M. (2006). RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*
- Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S. and Boccaccio, G. L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol. Biol. Cell* **16**, 405-20.
- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E. and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* **160**, 823-31.
- Unterholzner, L. and Izaurralde, E. (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* **16**, 587-96.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. and Seraphin, B. (2002). Human Dcp2 : a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J.* **21**, 6915-24.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F. and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1

- provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* **118**, 981-92.
- Yang, F., Peng, Y., Murray, E. L., Otsuka, Y., Kedersha, N. and Schoenberg, D. R. (2006a). Polysome-Bound Endonuclease PMR1 Is Targeted to Stress Granules via Stress-Specific Binding to TIA-1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8803-8813.
- Yang, W. H., Yu, J. H., Gulick, T., Bloch, K. D. and Bloch, D. B. (2006b). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *Rna* **12**, 547-54.
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M. R., Eystathiou, T., Rubin, R. L., Fritzler, M. J. and Chan, E. K. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J. Cell Sci.* **117**, 5567-78.
- Zekri, L., Chebli, K., Tourriere, H., Nielsen, F. C., Hansen, T. V., Rami, A. and Tazi, J. (2005). Control of fetal growth and neonatal survival by the RasGAP-associated endoribonuclease G3BP. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8703-16.